

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. Helmut Steinmetz

**Bedeutung von Endothelzellapoptosen bei der
Destabilisierung der hochgradigen Karotisstenose**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von Christian Landgraf
aus Erlangen

Frankfurt am Main
2007

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Matthias Sitzer

Koreferent: Prof. Dr. Thomas Schmitz-Rixen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2008

Meinen Eltern

“Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.“

J. W. Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung.....	10
2 Wissenschaftlicher Hintergrund	11
2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Karotisstenose	11
2.1.1 Schlaganfallinzidenz.....	11
2.1.2 Risiko einer zerebralen Ischämie.....	11
2.1.3 Etablierte Therapieverfahren	13
2.1.4 Risikomodulierende Faktoren.....	14
2.2 Atherosklerose	14
2.2.1 Anatomie der Gefäßwand.....	17
2.2.2 Risikofaktoren.....	17
2.2.2.1 Nicht beeinflussbare Risikofaktoren.....	18
2.2.2.2 Beeinflussbare Risikofaktoren.....	18
2.3 Pathomechanismen innerhalb der Gefäßwand	19
2.3.1 Endothel als Initiator?	20
2.3.1.1 Generelle Aspekte des Endothels.....	20
2.3.1.1.1 Endothel und primäre Homöostase	21
2.3.1.1.2 Antithrombotische Eigenschaften des Endothels	22
2.3.1.1.3 Endothel und Fibrinolyse	23
2.3.1.1.4 Endothel und Vasoregulation	23
2.3.1.2 Funktionelle Imbalance des Endothels	26
2.3.1.2.1 Leukozytenadhäsion	26
2.3.1.2.2 Prothrombotischer Zustand	27
2.3.1.2.3 Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen	29
2.3.2 Lipoproteinretention.....	29
2.3.3 Migration von Inflammationszellen	31
2.3.4 Umwandlung zu Makrophagen.....	32
2.3.5 Mitwirkung von Mastzellen und T-Zellen	33
2.3.6 Schaumzellausbildung.....	34
2.4 Mechanismen der Instabilität	34

2.4.1 Thrombusformation nicht an Ruptur gebunden	35
2.4.2 Inflammation	37
2.4.3 Matrixmetalloproteinasen	40
2.4.4 Neovaskularisierung	41
2.4.5 Plaquethrombogenität	41
2.4.6 Infektion	43
2.4.7 Programmierter Zelltod (Apoptose)	44
2.5 Allgemeine Bemerkungen zur Apoptose	44
2.5.1 Rolle der Caspasen	45
2.5.2 Extrinsischer Pfad („Death-receptor pathway“)	46
2.5.3 Intrinsischer Pfad („mitochondrial pathway“)	46
2.6 Bedeutung der Apoptose für atherosklerotische Plaques	47
2.6.1 Mehrere Zellreihen betroffen	47
2.6.1.1 Apoptosen glatter Muskelzellen	48
2.6.1.2 Apoptosen von Makrophagen	49
2.6.1.3 Apoptosen vaskulärer Endothelzellen	51
2.6.2 Co-Lokalisation zu Inflammation	54
2.6.3 Prokoagulatorisches Potential	55
2.6.4 Relation zum Blutfluss	57
2.6.5 Oxidativer Stress	58
2.6.6 Endothelzellregenerate	59
3 Material und Methoden	60
3.1 Patientenkollektiv	60
3.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien	60
3.1.2 Klinische Merkmale	61
3.1.3 Interview	63
3.2 Materialgewinnung	63
3.3 Histologische Aufbereitung	64
3.3.1 Schnittanfertigung von Endarterektomiepräparaten	64
3.3.2 Übersichtsfärbungen Endothel	65
3.3.2.1 Hämatoxilin-Eosin (HE-) Färbung	65
3.3.2.2 van Gieson-Färbung	66
3.3.3 CD31-Endothelzellmarkierung	67

3.3.4 TUNEL-Apoptosenfärbung	69
3.4 Bildbearbeitung und Morphometrie	71
3.5 Statistik	72
4.1 Aufstellung asymptomatisch vs. symptomatisch	74
4.2 Gegenüberstellung unrupturierte vs. rupturierte Plaqueoberfläche	74
4.3 Nichtparametrische Tests: symptomatisch vs. asymptomatisch	75
4.4 Nichtparametrische Tests: rupturierte vs. unrupturierte Plaqueoberfläche	75
4.5 Ergebnisse zusammengefasst	76
5.1 Diskussionsansätze	77
5.1.1 Korrelation zwischen EC-Apoptosen und Symptomatik?	77
5.1.2. Korrelation EC-Apoptosen mit rupturierter Oberfläche?	79
5.1.3 Intakte Plaqueoberfläche vs. Symptomatik?	80
5.2 Fehlermöglichkeiten ("Limitations")	81
5.2.1 Erschwerte Detektion von Apoptose in vivo	82
5.2.2 Variabilität in Zeitachsen	83
5.2.3 Multiple Mechanismen gleichzeitig	84
5.2.4 OP-Verfahren und Materialaufbereitung	85
5.2.5 Klassifizierung der Symptomatik	87
5.3 Klinischer Ausblick	88
5.3.1 Serologische Marker	88
5.3.2 Therapieziel Apoptose?	89
5.3.2.1 Antioxidantien	89
5.3.2.2 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)	90
5.3.2.3 ACE-Hemmer	91
5.3.2.4 Antiinflammatorische Therapie	91
5.4 Fazit	91
6. Zusammenfassung	93
7. Anhang	95
7.1 Summary	95
7.1 Danksagungen	98
7.2 Lebenslauf	99
7.3 Schriftliche Erklärung	101
8. Literaturverzeichnis	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt einer regelrechten Gefäßwand	17
Abbildung 2: Physiologischer Zustand des Endothels	21
Abbildung 3: Dysfunktionelles Endothel	26
Abbildung 4: Effekt des LDL auf Inflammation.....	30
Abbildung 5: Monozytenmigration in die Gefäßwand	33
Abbildung 6: Histologie einer Plaqueruptur.....	36
Abbildung 7: Nicht-rupturierter, symptomatischer Karotisplaque	37
Abbildung 8: Thrombusformation nach Immunzellaktivierung	39
Abbildung 9: Eversion und Dilatation der A. carotis interna	64
Abbildung 10: CD31-Antikörper markierte Endothelzellschicht.....	68
Abbildung 11: TUNEL-Technik zur Apoptosenfärbung	70
Abbildung 12: AHA-Stadien der Plaqueformation nach Sary.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mögliche Symptome beim Vorliegen einer symptomatischen Karotisstenose.....	12
Tabelle 2: AHA-Klassifikation atherosklerotischer Läsionen nach Sary.....	16
Tabelle 3: Risikofaktoren der Atherosklerose	19
Tabelle 4: Vasoregulatorische Substanzen des Endothels.....	24
Tabelle 5: Histopathologie und Rolle der Apoptose bei Atherosklerose	47
Tabelle 6: Klinische Merkmale der Studienpopulation	62
Tabelle 7: Aufstellung symptomatisch vs. asymptomatisch	74
Tabelle 8: Gegenüberstellung unrupturierte vs. Rupturierte Plaques	74
Tabelle 9: Nichtparametrische Tests: symptomatisch vs. asymptomatisch	75
Tabelle 10: Nichtparametrische Tests: rupturierte vs. Unrupturierte Plaques.....	75

Abkürzungsverzeichnis

A. - Arteria

Abb. – Abbildung

ACI – Arteria carotis interna

ACS – Akutes Koronar Syndrom

AHA – American Heart Association

AT3 – Antithrombin III

bzw. – beziehungsweise

CRP – C-reaktives Protein

d.h. – das heißt

ET - Endothelin-1

Fa - Firma

HDL – High Density Lipoprotein

HS – Heparan sulfat

ICAM – Intercellular Adhesion Molecule

IL – Interleukin

IFN - Interferon

LDL – Low Density Lipoprotein

MCA – A. cerebri media

MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1

MES – Mikroemboliesignale

MMP – Matrix-Metalloproteinase

NASCET – North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial

o. g. – oben geannnten

oxLDL – oxidiertes LDL

PAF – Platelet Activating Factor

PAR-1 – Protease Activated Receptor-1

PGI₂ – Prostacyclin

PRIND – Prolongiertes Reversibles Ischämisch Neurologisches Defizit

PS – Phosphaditylserin

RT - Raumtemperatur

SMC – Smooth Muscle Cells

sog. – sogenannt

TCD – Transkranielle Dopplersonografie
TEA – Thrombendarterektomie
TFPI – Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIA – Transitorische ischämische Attacke
TF – Tissue factor (Gewebsfaktor)
TM – Thrombomodulin
TNF – Tumor Nekrose Faktor
u. a. – unter anderem
VCAM - Vascular Cell Adhaesion molecule
z. B. – zum Beispiel
z. T. – zum Teil

1 Einleitung

Akute ischämische Krankheitsbilder wie das akute Koronarsyndrom (ACS) und der Schlaganfall sind Manifestationen einer fortgeschrittenen Atherosklerose. Im Zusammenhang mit zerebral-ischämischen Symptomen spielt die Gefäßstenose in Höhe der extrakraniellen Karotidbifurkation häufig eine entscheidende Rolle. Molekulare Mechanismen, die zu Plaqueinstabilität, Destabilisierung und nachfolgender neurologischer Symptomatik führen sind bislang nicht hinreichend geklärt.

Verschiedene pathoanatomische Arbeiten konnten darlegen, dass ein sogenannter instabiler Karotisplaque im überwiegenden Anteil gekennzeichnet ist durch eine an der Gefäßwand makroskopisch und mikroskopisch nachweisbare lumenseitige Plaqueruptur und eine begleitende intraluminale oberflächenassoziierte Thrombusformation, die letztendlich für embolische Komplikationen im Sinne einer zerebralen Ischämie verantwortlich ist. Hierzu gegenübergestellt existieren jedoch histopathologische Untersuchungen, die nahelegen, dass die Plaqueruptur nicht allein als Mechanismus für eine Thrombusformation mit nachfolgender Destabilisierung in Frage kommt. Solche Defekte mit einer begleitenden unrupturierten Plaqueoberfläche sind in der Literatur unter dem Begriff „Erosion“ zusammengefasst und gehen aller Voraussicht nach mit morphologischen oder funktionellen Veränderungen der luminalen Plaqueoberfläche einher, die zur Amplifizierung prokoagulatorischer Eigenschaften mit konsekutiver Thrombusbildung ohne Ruptur führen.

Klinische Forschung muss daher Wege identifizieren, auf welche Art und Weise eine atheromatöse Gefäßläsion in einen instabilen Zustand mit Ausbildung einer Erosion, d.h. Läsion ohne nachweisbarer Ruptur, übergehen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll anhand des Atherosklerosemodells der humanen Karotiden die Rolle speziell von Endothelzellapoptosen innerhalb eines operativ entfernten Arteria carotis interna Plaques im Zusammenhang mit dessen Destabilisierung untersucht werden. Bislang ist nicht klar, ob und wenn in welchem

Ausmaß speziell Endothelzellapoptosen zur Destabilisierung der hochgradigen Karotisstenose beitragen können.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Karotisstenose

2.1.1 Schlaganfallinzidenz

Die Schlaganfallinzidenz zeigt eine deutliche Altersbeziehung mit annähernder Verdoppelung der Inzidenzraten im hohen Alter. Männer sind generell häufiger betroffen, dieser geschlechtsspezifische Vorteil ist im fortgeschritteren Alter jedoch rückläufig.

Der überwiegende Anteil (rund 85%) der Schlaganfälle beruht auf ischämischen Ereignissen und ist ätiologisch auf atherosklerotische Ereignisse (65%), kardiogene Embolien (20%) und zerebrale Blutungen (15%) zurückzuführen (Immediate anticoagulation of embolic stroke: brain hemorrhage and management options. Cerebral Embolism Study Group. Stroke 15:779-789, 1984) (Leiß, v.Bergmann, 1987).

2.1.2 Risiko einer zerebralen Ischämie

Eine Stenose im Bereich der extrakraniellen A. carotis interna stellt einen möglichen Manifestationsort der fortgeschrittenen Atherosklerose dar. Zwischen 5 und 10% aller Menschen älter als 65 Jahre weisen an diesem an der Hirnversorgung beteiligten Gefäß eine mehr als 50%ige Lumeneinengung auf und bis zu 15% aller ischämischen Schlaganfälle werden durch eine derartige Stenose verursacht (Fine-Edelstein et al., 1994) (Sacco, 1994).

Analog der Präsenz einer Symptomatik wird zwischen asymptomatischen und symptomatischen Karotisstenosen unterschieden. Bei einer asymptomatischen Karotisstenose mit einer Lumeneinengung zwischen 50 und 99% besteht ein geringes jährliches Schlaganfallrisiko zwischen 1-3,2% (Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic

Carotid Atherosclerosis Study. JAMA 273:1421-1428, 1995) (Hennerici et al., 1987; Inzitari et al., 2000).

Kommt es zu einer mindestens einmaligen zerebralen ischämischen Symptomatik so spricht man von einer „symptomatischen Karotisstenose“ sofern die Symptome eindeutig der Karotisstenose zuzuordnen sind. Da die Klinik mit den betroffenen, jeweils spezifische Hirnareale versorgenden, Gefäßterritorien korreliert, gleichen die Symptome von Durchblutungsstörungen im Bereich der ACI und der nachgeschalteten Gefäßabschnitte sehr häufig denen einer Läsion des vorderen Hirnkreislaufs („Karotisstromgebiet“). Beim Befall eines Astes können die Symptome isoliert, beim Befall mehrerer Äste in Kombination auftreten (Vgl. Tab. 1). Wegen der guten Kollateralversorgung rufen Karotisthrombosen oft solche Symptome hervor, die dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media zuzuordnen sind (Poeck, 1994).

A. carotis interna (extrakraniell)	Kontralaterale Halbseitensymptome, flüchtige ipsilaterale Sehstörungen
A. ophthalmica	Amaurosis fugax, Retinainfarkt
A. cerebri media	Sprachstörungen, kontralaterale brachiofacial betonte Hemiparese, Dysarthrie, motorische und globale Aphasie, Apraxie, Kopfwendung zum Herd
A. cerebri anterior	distal betonte kontralaterale Monoparese des Beines mit Sensibilitätsstörungen
A. cerebri posterior	kontralaterale homonyme Hemianopsie, Quadrantenhemianopsie

Tabelle 1: Mögliche Symptome beim Vorliegen einer symptomatischen Karotisstenose

(modifiziert nach Poeck, K. Neurologie, Springer-Verlag, 1994.)

Beim Vorliegen einer Symptomatik steigt das Risiko eines nachfolgenden ipsilateralen Schlaganfalls auf 4-18% (Barnett et al., 1998). Mit weiterer Zunahme des Stenosegrads erhöht sich bei einer Lumeneinengung zwischen 50-99% das Risiko pro zusätzlich 10%-igem Stenosegrad um ca. 4 absolute Prozent (Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). Lancet 351:1379-1387, 1998).

Nach einem vorhergegangenen ischämischen Ereignis lässt sich für die Karotisstenose ein sogenannter „instabiler“ Zustand charakterisieren; in den ersten drei Monaten nach aufgetretener Erstsymptomatik besteht ein 3-6 fach erhöhtes Schlaganfallrisiko (Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). Lancet 351:1379-1387, 1998; Barnett et al., 1998).

2.1.3 Etablierte Therapieverfahren

Die therapeutischen Optionen um ein nachfolgendes Schlaganfallrisiko zu minimieren bestehen in der operativen Karotisendarterektomie (CEA), die neben der erst in den letzten Jahren etablierten Möglichkeit des endovaskulären Stentings das momentane Verfahren der Wahl darstellt (Goldstein, 2003). Patienten mit einer vorliegenden hochgradigen Karotisstenose ($\geq 70\%$ Lumeneinengung) und die innerhalb der letzten 4 Monate symptomatisch waren profitieren von der Thrombendarteriektomie (Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. N Engl J Med 325:445-453, 1991a; Mayberg et al., 1991; Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). Lancet 351:1379-1387, 1998; Barnett et al., 1998). Ein anhaltender klinischer Nutzen der Operation – auch nach vielen Jahren – ist durch Studien belegt jedoch auch von möglichen perioperativen Komplikationen abhängig (Barnett, Meldrum, 2000). Bislang gilt die TEA bei mehr als 70%igen Stenosen als Goldstandard bei der Wahl des Therapieverfahrens. Das Risiko-/Nutzenverhältnis ist bei asymptomatischen sowie symptomatischen niedriggradigen Stenosen wesentlich niedriger (Barnett et

al., 1998), so dass hier die zu wählende Vorgehensweise noch umstritten ist (Barnett, Meldrum, 2000) und daher häufig von weiteren Faktoren wie Patientenalter und Begleiterkrankungen abhängig gemacht wird. Zentren mit niedrigen perioperativen Komplikationsraten sichern daher auch einen Bestand an operierten asymptomatisch-niedriggradigen Karotisstenosen, die für die wissenschaftliche Untersuchung zur Verfügung stehen.

Die an verschiedenen Zentren durchgeführten Stentverfahren sind derzeit noch Gegenstand andauernder klinischer Studien.

2.1.4 Risikomodulierende Faktoren

Aufgrund des niedrigen jährlichen Schlaganfallrisikos für asymptomatische Karotisstenosen müssen weitere risikomodulierende Faktoren herangezogen werden, die in der Lage sind, asymptomatische Stenosen mit erhöhtem Apoplexrisiko zu identifizieren. Derzeit geht man von drei solcher Faktoren aus, die in einem zunehmenden Stenosegrad (Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. JAMA 273:1421-1428, 1995), einer reduzierten ipsilateralen Vasoreaktivität (Markus, Cullinane, 2001) sowie in transkraniell ableitbaren Mikroemboliesignalen (Molloy, Markus, 1999) liegen.

2.2 Atherosklerose

Atherosklerose, eine der führenden Todesursachen der westlichen Welt, ist ein das arterielle Gefäßsystem betreffender, diffuser systemischer Prozess, der im frühen Kindesalter beginnt und sich überwiegend asymptomatisch im Laufe des Erwachsenenalters weiterentwickelt. Erst später entwickeln sich aus den fortgeschrittenen Atheroskleroseprozessen ischämische kardiale Syndrome (KHK), der Schlaganfall (TIA) sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).

Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts wurde die Arteriosklerose als der unausweichlich-degenerativer Prozess des Alters angesehen. Sir William Osler beschrieb um 1908 einen im Alter zunehmenden „Gefäßverschleiss“ (Osler, 1908).

Das Verständnis der Pathogenese der Arteriosklerose ist in den letzten zwanzig Jahren allerdings massiv revolutioniert worden, da vor allem die Arbeiten von Russell Ross eine dominante inflammatorische Komponente der Erkrankung propagierten (Ross, 1999). Durch stetige Neuerkenntnisse gibt es keine generell akzeptierte Definition der Atherosklerose und eine Abgrenzung zur normalen Alterung von Arterien fällt schwer. Während die im hohen Lebensalter auftretende Alterung histologisch mit einer diffusen Intimaverdickung und nachfolgendem Elastizitätsverlust einhergeht beobachtet man bei dem pathologischen Bild der Atherosklerose eine typische Ausbildung fokal verdickter Läsionen fibrotischer Plaques, die bei Disruption akute ischämische Komplikationen hervorrufen können.

Atherosklerotische Läsionen (Synonym: Atherom, Plaque) imponieren als asymmetrische, fokale Verdickungen der Arterieninnenschicht und bestehen aus einem Konglomerat von Zellen, bindegewebigen Elementen, Lipiden und Zelltrümmern (Sary et al., 1995). Aus dem Blutstrom beteiligen sich zusätzlich eingewanderte inflammatorische und immunogene Zellen. Man weiß heute, dass während des Atheroskleroseverlaufs vor allem die Intima der großen und mittleren Arterien betroffen ist (Sary et al., 1995), in späteren Stadien auch die darunterliegenden Schichten Media und Adventitia (Rauch et al., 2001). Dem Atherom voran geht ein initialer „fatty streak“, eine Region intimaler Verdickung durch die subendotheliale Akkumulation von Lipiden, Makrophagen und einigen T-Zellen. Diese frühen Läsionen sind bei den meisten Menschen unter 30 Jahren bereits präsent, häufig schon bei Säuglingen im Alter von bis zu 6 Monaten und stets asymptomatisch. Solche auf der Intima imponierende „Präatherome“ scheinen die Grundlage für dort später lokalisierbare Arterioskleroseprozesse zu bilden (Sary, 2000).

Sary führte 1995 erstmals eine Klassifikation von Atherosklerosestadien ein, die bis heute Gültigkeit besitzt und auch von der AHA in der folgenden Form akzeptiert wird:

Typ (Histologie)	Charakteristika	Klinik
Typ I = Initialläsion (Makrophagen, Schaumzellen)	Lipid- akkumulation	Stumm
Typ II = Fatty streak (Intrazelluläre Lipide)		
Typ III = Intermediärläsion (Typ II & extrazell. Lipide)		
Typ IV = Atherom (Typ II & extrazell. Lipidkern)		
Typ V = Fibroatherom (Lipidkern (oft multiple) mit aufsitzender fibrotischer Deckplatte)	SMC- Proliferation↑	Stumm oder symptomatisch
Typ VI = Komplexe Läsion (Oberflächendefekt, Einblutung mit Thrombus)	(Ruptur→) Thrombus	

Tabelle 2: AHA-Klassifikation atherosklerotischer Läsionen nach Stary

(modifiziert nach: Stary et al, A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. Circulation. 1995;92:1355-1374.)

Es sollte angemerkt werden, dass der Begriff der „Erosion“, d.h. eine Destabilisierung ohne Ruptur, bislang nicht in die AHA-Klassifikation aufgenommen wurde und aus diesem Grund derzeit wiederholt überarbeitete, uneinheitliche Klassifikationen zur Anwendung kommen (Fuster et al., 2005).

Nach kurzer Betrachtung eines regelrechten Gefäßquerschnitts und den möglichen Atheroskleroserisikofaktoren sollen einzelne zelluläre Infiltrationsprozesse, die bedeutenden Einfluss auf die Plaqueprogression haben, näher beleuchtet werden.

2.2.1 Anatomie der Gefäßwand

Eine Arterienwand besteht aus drei morphologisch unterschiedlichen Schichten (Vgl. Abb. 1). Die dem Lumen zugewandte Schicht wird als Intima bezeichnet und ist eine dünne, von Endothelzellen ausgekleidete, Monoschicht. Deren Zellverband wird durch aneinandergeschlossene „tight-junctions“ aufrechterhalten. An diese Endothelschicht schließt sich nach Aussen ein Geflecht aus elastischen Fasern an, die als Membrana elastica interna die Grenze zur Tunia Media bildet. Die Media (Mittelschicht) besteht zum überwiegenden Teil aus glatten Muskelzellen (SMC). Die Adventitia bildet die äußerste der drei Schichten der Gefäßwand und verbindet das Gefäß mit den umliegenden Strukturen durch elastische Fasern und Bindegewebe, welches auch die das Gefäß selbst versorgenden Vasa vasorum beinhalten.

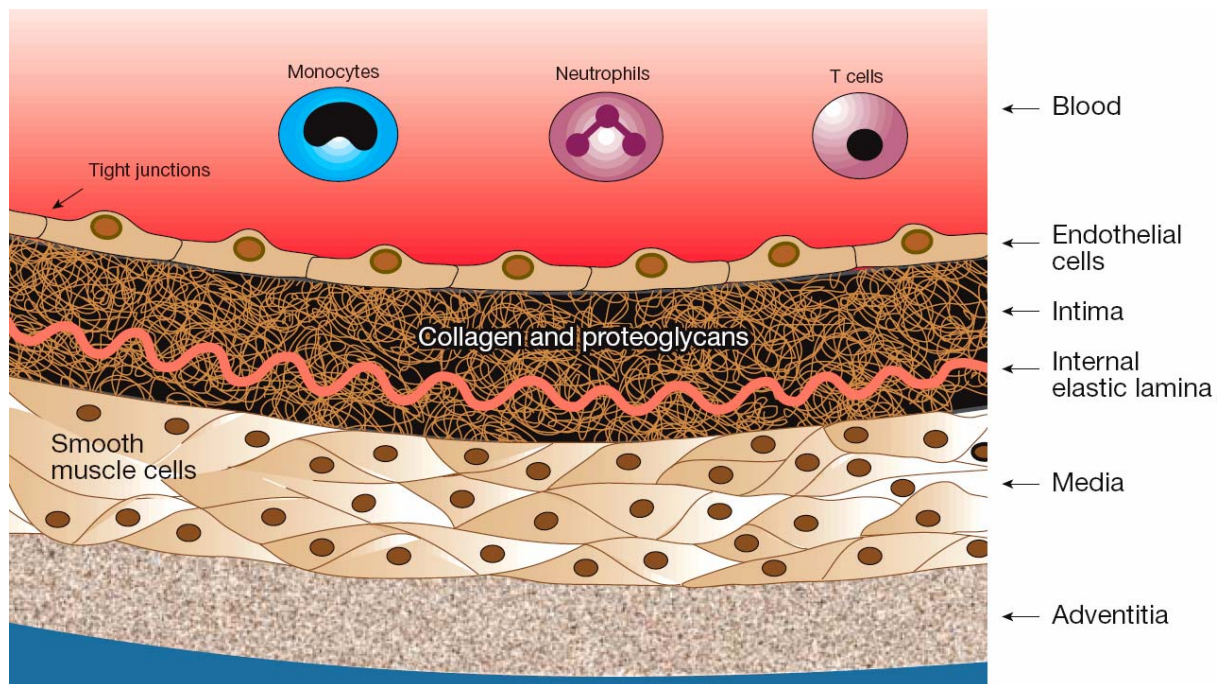


Abbildung 1: Querschnitt einer regelrechten Gefäßwand

(Quelle: Lusis, A. Atherosclerosis. Nature 2000; 407:233-241.)

2.2.2 Risikofaktoren

Die genauen pathophysiologischen Vorgänge, die zur Manifestation einer Atherosklerose führen sind komplex. Es existieren zahlreiche bekannte Risikofaktoren, die das Auftreten des Krankheitsbildes statistisch signifikant

begünstigen. Diese können Faktoren mit einer genetischen Komponente darstellen (=endogen) oder aber auch durch Umwelteinflüsse (=exogen) bedingt sein.

2.2.2.1 Nicht beeinflussbare Risikofaktoren

Obwohl die genaue Bedeutung der Serumlipide für den Hirninfarkt ungeklärt bleibt, besteht eine direkte Korrelation zwischen erhöhten Plasma-Lipoproteinspiegeln und der Entwicklung atheromatöser Plaques (Gordon, Rifkind, 1989). Eine positive Familienanamnese (Goldbourt, Neufeld, 1986), Diabetes mellitus (Beks et al., 1997), erhöhtes Lipoprotein-A (Kronenberg et al., 1999; Sutton-Tyrrell et al., 1996), die arterielle Hypertension (Inzitari et al., 1986) sowie Adipositas (Karason et al., 1999) bilden weitere unbeeinflussbare (oft auch als „endogene“ bezeichnete) Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose.

2.2.2.2 Beeinflussbare Risikofaktoren

Exogene (oder potentiell „vermeidbare“) Einflüsse sind im wesentlichen Sinne beeinflussbar. Sie umfassen den Nikotinkonsum (Tell et al., 1994), eine cholesterinreiche Ernährung, Bewegungsmangel (Assmann et al., 1999) sowie möglicherweise das Vorhandensein bestimmter infektiöser Erreger (Hu et al., 1999). Die Kombination aus dauerhaft erhöhten Serum-Cholesterolspiegeln, der arteriellen Hypertension sowie dem Nikotinkonsum konnten eindeutig mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Karotisstenose in einer untersuchten Patientenpopulation in Verbindung gebracht werden (Wilson et al., 1997). Weiterhin wies eine Population mit den positiven Risikofaktoren Nikotinkonsum, Familienanamnese (bezüglich Schlaganfällen), KHK sowie Adipositas eine gehäufte Inzidenz an Stenosen im Bereich der ACI auf (Bogousslavsky et al., 1985). Ford et al. stellten in einer Studie eine signifikant-positive Korrelation zwischen erhöhten Gesamtcholesterinspiegel und dem fortschreitenden Ausmaß einer Plaqueformation im Bifurkationsbereich der Karotisregion dar (Ford et al., 1985).

Die Früherkennung und die nachfolgende Eliminierung vermeidbarer Risikofaktoren stellen daher eine wichtige Maßnahme der Primärprävention in der Bekämpfung des Schlaganfalls dar.

Nicht-beeinflussbare	<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Männliches Geschlecht • Positive Familienanamnese • Genetische Prädisposition
Potentiell beeinflussbare	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperlipidämie • Hypertension • Nikotin • Diabetes mellitus

Tabelle 3: Risikofaktoren der Atherosklerose

(modifiziert nach Cotran, Kumar, Collins: "Robbins Pathological basis of disease", 6th edition, Saunders Verlag Philadelphia 1998; S. 504.)

2.3 Pathomechanismen innerhalb der Gefäßwand

Mitte der 70er Jahre konnte erstmals der Zusammenhang zwischen erhöhtem Serum-Cholesterin und der Entwicklung einer Atherosklerose hergestellt werden, wobei dem LDL-Cholesterol die entscheidende Rolle zugesprochen wurde (Ross et al., 1984). In den letzten zwanzig Jahren hat jedoch eine im Inneren der Läsion kontinuierlich ablaufende, inflammatorisch-fibroproliferative Antwort herausragende Bedeutung für die Entstehung und Progression einer atheromatösen Formation gewonnen. Demnach stellt die Erkrankung keinen passiv-degenerativen sondern vielmehr einen aktiven Prozess dar (Libby et al., 2002) und verbindet chronische Entzündungsvorgänge durch eingewanderte Inflammationszellen mit Reaktionen ortsgebundener Zellen innerhalb der Gefäßwand. Die oft ineinandergreifenden komplexen Prozesse des Krankheitsbildes Atherosklerose sind bis heute nicht vollständig geklärt und werden durch eine Vielzahl von Mechanismen ausgelöst und beeinflusst.

2.3.1 Endothel als Initiator?

Über die Jahre hat sich die sogenannte Verletzungshypothese („response-to-injury“) des Endothels als die am weitesten akzeptierte These in der Initiation für atherosklerotische Gefäßprozesse durchgesetzt. Unter dem Einwirken bestimmter atherogener Agenzien kommt es zu einer initialen Dysfunktion der Endothelzellschicht. Das eigentliche auslösende Agens wurde bisher nicht eindeutig identifiziert, mögliche Faktoren werden jedoch in oxidierten Lipiden (oxLDL), Zytokinen, Proteasen, Scherkräften, freien Radikalen, Homocystein oder in einer Beteiligung infektiöser Erregern gesehen (Ross, 1999). Neben dem Verlust vasoaktiver Substanzen fördert eine derartige Dysfunktion die Prozesse der Erhöhung der Zellpermeabilität, die Unterhaltung einer lokalen Inflammation, die Oxidation von eingewanderten Lipoproteinen sowie den Verlust endothelial-antithrombotischer Eigenschaften des Endothels.

Detaillierte Eigenschaften des Endothels sowie einzelne pathologische Auswirkungen einer Dysfunktion sollen im folgenden näher beleuchtet werden.

2.3.1.1 Generelle Aspekte des Endothels

Die Endothelzellen des Gefäßsystems kleiden als flächendeckende Monoschicht innerhalb des menschlichen Organismus sämtliche Blutgefäße sowie die Innenwände der Herzkammern aus. Als Trennwand zwischen Blutstrom und Interstitium wurde bis vor einigen Jahren diese Zellschicht lediglich als inerte mechanische Barriere angesehen. Bereits 1980 konnte jedoch dargelegt werden dass die Präsenz eines intakten Endothels z. B. unabdingbare Voraussetzung für die vasodilatatorischen Eigenschaften des Acetylcholins darstellt (Furchgott, Zawadzki, 1980). Mittlerweile ist bekannt geworden, dass das Endothel als autokrines und parakrines Organ aktiv eine Vielzahl metabolischer Funktionen wahrzunehmen vermag.

Zu diesen zählen im einzelnen:

- Regulation von primärer Homöostase → Blutgerinnung und Fibrinolyse (Rosenberg, Rosenberg, 1984; Stern et al., 1988)
- Interaktion mit Immunzellen → Leukozyten (Kansas, 1996)
- Kontrolle des lokalen Gefäßtonus via Ausschüttung vasoaktiver Substanzen (NO, Endothelin, Prostazyklin) → Regulation des systemischen Blutdrucks (Ignarro, 1989)

Die nachfolgend näher zu beschreibenden einzelnen Funktionen werden in Abbildung 2 gegenüber nachteiligen Zuständen bildlich „aufgewogen“.

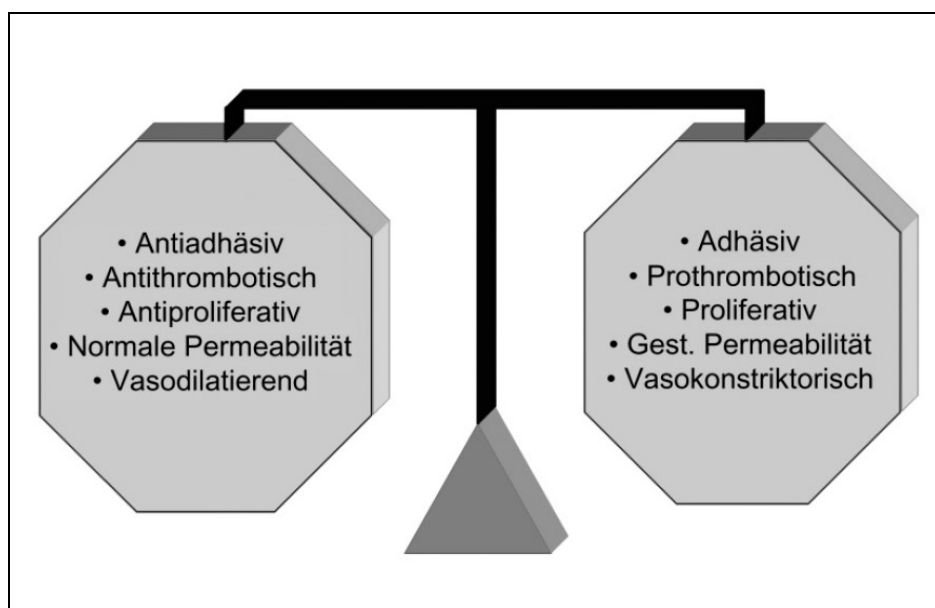


Abbildung 2: Physiologischer Zustand des Endothels

(Quelle: Schwarzacher, SP. Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. Journal für Kardiologie. 2002; 9: 122.)

2.3.1.1.1 Endothel und primäre Homöostase

Endothelien sind zur Eigensynthese multifunktionaler Glykoproteine befähigt, die die Initiation der (primären) Hämostase ermöglichen. Besonders die Substanzen von-Willebrandt-Faktor (vWF), Fibronektin und Thrombospondin (Preissner, 1989) stellen Syntheseprodukte des Endothel dar, die hierbei entscheidenden Anteil haben.

2.3.1.1.2 Antithrombotische Eigenschaften des Endothels

Eine der entscheidenden Funktionen des luminalen Endothelzellverbands ist es, einen kontinuierlichen Blutfluss durch das gesamte Gefäßsystem zu gewährleisten. Dies wird durch das Aufrechterhalten einer antithrombotischen Oberfläche erreicht, die der Adhäsion von Thrombozyten und einer nachfolgenden örtlichen Fibrinbildung entgegenwirkt.

Antikoagulatorische Mechanismen konzentrieren sich vor allem in einer funktionellen Einschränkung des Thrombins, das entscheidende Enzym der plasmatischen Blutgerinnung. Auch als Faktor 2 bezeichnet spaltet es als Protease Fibrinogen zu Fibrin. Thrombin ist nicht nur für die Fibrinbildung verantwortlich, sondern kann durch eine positive Rückkopplung auch seine eigene Aktivierung verstärken. Es ist außerdem einer der potentesten Thrombozytenaktivatoren.

Im physiologischen Zustand existieren Signalwege, die die Synthese und die lokale Aktivität des Thrombins einschränken können (Bauer et al., 1987). Die Endothelzelle ist von einer molekularen Matrix umgeben, die neben Glycosaminoglycanen auch Heparan Sulfat (HS) enthält. HS fördert die Aktivität von zellgebundenem Antithrombin III (AT-3), was der lokalen Thrombinkonzentration entgegenwirkt (Marcum, Rosenberg, 1984). Endothelzellen verhindern außerdem die Thrombinformation durch die Expression eines natürlichen Antikoagulanz namens Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (Sagripanti, Carpi, 1998), der in der Lage ist durch Komplexbildung mit Faktor Xa die prothrombotische Wirkung des TF-Faktor VIIa-Faktor-Xa Komplexes zu negieren (Broze, Jr., 1995).

Der Rezeptor Thrombomodulin (TM) vermittelt weitere antikoagulatorische Eigenschaften auf der Oberfläche von Endothelzellen (Esmon, Fukudome, 1995). Thrombin verliert nach Bindung an den spezifischen Rezeptor TM seine prokoagulatorischen Eigenschaften. Der entstehende Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktiviert anschliessend Protein C (Esmon, 1995), welches zusammen mit endothelialem Protein S imstande ist, die Gerinnungsfaktoren V und VIII zu inaktivieren (Sagripanti, Carpi, 2000).

2.3.1.1.3 Endothel und Fibrinolyse

Über die profibrinolytischen Oberflächeneigenschaften vaskulärer Endothelzellen existieren derzeit widersprüchliche Aussagen in der Literatur (TODD, 1959; Pandolfi, 1975). Übereinstimmend geht man davon aus, dass eine Beteiligung bei lokaler Fibrinolyse stadienabhängig in Erscheinung treten kann.

Kultivierte Endothelzellen verschiedener Gewebe sind Ursprungsorte des Tissue type Plasminogen Activators t-PA (Cines et al., 1998). Dieser konvertiert Plasminogen zu Plasmin, was den Endschritt des fibrinolytischen Systems darstellt. Die Bindung von t-PA an spezifische Rezeptoren, die auf der endothelialen Zelloberfläche lokalisiert sind, fördert dessen effektive lokale fibrinolytische Aktivität (Barnathan et al., 1988). Eine spezifische Bindungsstelle für Plasminogen konnte bislang auf Endothelzellen in-vivo allerdings nicht identifiziert werden.

Endothel in Kultur ist auf der anderen Seite auch imstande, Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) zu synthetisieren. Dieser Stoff wird auf bestimmte Stimuli wie Thrombin, verschiedene Zytokine, oxLDL sowie Endotoxine (Cines et al., 1998) - besonders von Bedeutung die Antwort auf inflammatorische Prozesse - ausgeschüttet (Sawdey, Loskutoff, 1991). Der PAI agiert als Gegenspieler des t-PA und fördert durch daraus resultierende sinkende Plasminspiegel die Thrombogenität (Sagripanti, Carpi, 2000).

2.3.1.1.4 Endothel und Vasoregulation

Neben den genannten Funktionen sezernieren Endothelzellen eine Reihe von Mediatoren, die im physiologischen Zustand nützliche, vasoregulatorische Eigenschaften vermitteln. Das Endothel beteiligt sich an der Regulation des systemischen Blutdrucks und des lokalen Blutflusses durch Freisetzung der Vasodilatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) sowie der vasokonstriktorisch wirksamen Gegenspieler Endothelin (ET) und Platelet-Activating Factor PAF (Cines et al., 1998). Diese Stoffe werden als Antwort auf externe Stimuli freigesetzt und besitzen zusätzliche Effekte, die über die eigentliche Vasoregulation

hinausgehen. Tabelle 4 führt die unterschiedlichen vasoaktiven Substanzen endothelialen Ursprungs auf.

Substanz	Effekt	weitere Effekte
Stickstoffmonoxid (NO)	Vasodilatation	Basaltonus, Leukozytenadhäsion↓, Thrombozytenadhäsion↓, SMC-Proliferation↓, SMC-Migration↓
Prostacyclin (PGI ₂)	Vasodilatation	Thrombozytenadhäsion↓
Platelet-Activating Factor (PAF)	Vasokonstriktion	Leukozytenadhäsion↑
Endothelin (ET-1)	Vasokonstriktion	Pro-Mitogen auf SMC

Tabelle 4: Vasoregulatorische Substanzen des Endothels

(Quelle: Cines, DB. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 1998;91:3527-61.)

Isoformen von NO-Synthasen (eNOS), die in Endothelzellen aktiv vorliegen, synthetisieren das Stickstoffmonoxid (NO) durch Stimulation verschiedener Substanzen. Dazu zählen neben Thrombin auch Bradykinin, Substanz P und der muskarinerge Agonist Acetylcholin. Das NO unterhält multiple Funktionen des Gefäßsystems: erstens wird der Vasotonus durch die auf SMC vermittelte relaxierende Wirkung des NO reguliert (Loscalzo, Welch, 1995). Zweitens inhibiert endotheliales NO die einen Thrombus unterstützenden Thrombozytenfunktionen Adhäsion, Aktivierung sowie Aggregation und fördert zusätzlich aktiv deren Disaggregation (Mendelsohn et al., 1990). PGI₂ agiert synergistisch mit NO um weitere Schritte der Kaskade, die für die Aktivierung von Thrombozyten verantwortlich ist, zu blockieren (Stamler et al., 1989).

Zusätzlich zu den genannten Effekten auf die Gerinnung ist NO drittens in der Lage, eine Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand zu inhibieren (Kubes et al., 1991) und intimaler Migration von SMC entgegenzuwirken (Marks et al., 1995). Diese Inhibition schützt während der Atherogenese vor der neointimalen Proliferation, die später im Text noch behandelt wird. Dem durch Endothel freigesetzten NO kommt also eine

außerordentlich bedeutsame Rolle bei lokalen Schutz- und Reparaturmechanismen zuteil.

Neben dem potenten Vasodilatator NO sind die Endothelzellen des weiteren in der Lage, Endothelin-1 (ET) zu synthetisieren (Levin, 1996), der als stärkster bislang nachgewiesener Vasokonstriktor gilt. Stimuli für die Synthese von ET sind vor allem lokal-hypoxische Zustände, Scherkräfte und Ischämie (Cines et al., 1998). Durch Rezeptorbindung von ET auf der Oberfläche von SMC der Gefäßwand kommt es zu intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderungen, die in einer Kontraktion der glatten Muskelzelle münden (Simonson, Dunn, 1990). Von besonderer Bedeutung ist der persistierende Effekt der Konstriktion auch nach Abdissoziation des ET von dessen Rezeptor, was mit einer verlängerten Verweildauer des intrazellulären Kalziums erklärt wird. NO beschleunigt aber im Normalzustand die Senkung des Kalziumspiegels innerhalb der glatten Muskelzelle (Goligorsky et al., 1994). In Zuständen endothelialer Dysfunktion mit begleitender reduzierter NO-Verfügbarkeit kommt es so zu einer Wirkpotentierung des ET, was folglich eine vermehrte Vasokonstriktion zur Folge hat (Lopez et al., 1990).

Eine weitere differenzierte Regulation des Gefäßtonus erlaubt die Synthese zweier zusätzlicher Gegenspieler in Form des vasodilatatorisch wirksamen Prostacyclin (PGI_2) und des Vasokonstriktors Platelet-Activating Factor (PAF), die jedoch beide nicht fortlaufend innerhalb Endothelzellen vorliegen sondern wiederum als Antwort auf Stimuli sezerniert werden (Cines et al., 1998).

PAF wird auf der Oberfläche des Endothels exprimiert und agiert dort unter Förderung der Bindung an Leukozyten (Lorant et al., 1995). Die spezielle Wirkung auf Gefäße konnte in-vitro als konzentrationsabhängig charakterisiert werden. Zusätzlich ist die Konstriktion abhängig von der Anwesenheit von Leukotrienen und Mediatoren aktivierter Leukozyten (Zimmerman et al., 1996).

PGI_2 wird rasch von Endothelzellen freigesetzt und verhindert die örtliche Thrombozytenaggregation. Als eines der ersten Stoffe, die für ihre vasodilatatorischen Funktionen bekannt wurde bindet es an SMC-ständigen Oberflächenrezeptoren, die relaxierenden Effekt auf die SMC vermitteln (Coleman et al., 1994).

2.3.1.2 Funktionelle Imbalance des Endothels

Durch pathologische Stimuli kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion, die zunächst eine verstärkte Leukozytenadhäsion zur Folge hat und im weiteren durch eine Erhöhung der Permeabilität für zirkulierende Lipoproteine (LDL) mit nachfolgend vermehrter LDL-Deposition in die Gefäßwand gekennzeichnet ist. Zusätzlich bewirkt der Verlust antithrombotischer Eigenschaften in Begleitung mit einem zunehmenden Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen eine lokale Thrombogenitätssteigerung, die durch das Überwiegen der vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen verstärkt wird.

Abbildung 3 zeigt das „Umkippen“ endothelialer Eigenschaften, was schliesslich in einer Dysfunktion endet. Es überwiegen dann negative, eine Atherogenese begünstigende, Faktoren.

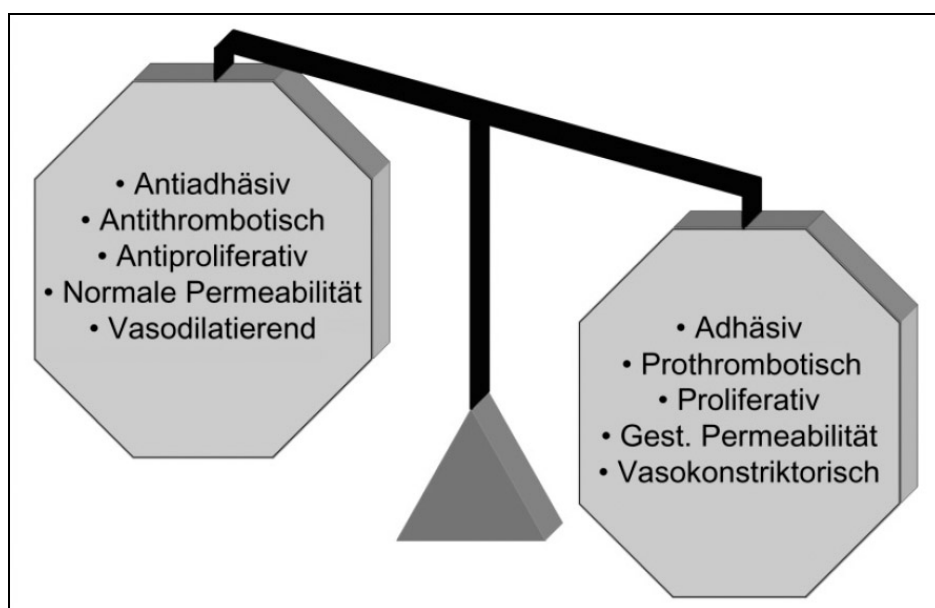


Abbildung 3: Dysfunktionelles Endothel

(Quelle: Schwarzacher, SP. Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. Journal für Kardiologie. 2002; 9: 122.)

2.3.1.2.1 Leukozytenadhäsion

Die physiologische Barrierefunktion der Endothelzellen wirkt einer Adhäsion von Zellen der Blutzirkulation ständig entgegen. Auf der Oberfläche aktivierter

Endothelien werden während der Atherogenese jedoch selektiv bindende Moleküle exprimiert, die in der Lage sind, Leukozyten aus dem mit der Gefäßwand in Kontakt stehendem Blutstrom anzuheften. Die Adhäsion der Zellen wird durch Expression von sog. Adhäsionsmolekülen wie Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Endothelial-leukocyte Adhesion Molecule-1 (E-Selektin) ermöglicht (Jang et al., 1994). Neben einer atherogenen Diät (Li et al., 1993, Carlos, Harlan, 1994) ist auch in der Gefäßwand lokalisiertes, oxidiertes LDL imstande, die Ausbildung dieser Oberflächenmoleküle zu induzieren und kontinuierlich zu verstärken (Cybulsky, Gimbrone, Jr., 1991). Mit Hilfe der Adhäsionsmoleküle werden Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blutstrom gebunden (Ross, 1993), was unmittelbar danach die subintimale Migration dieser Zellen erleichtert. Insbesondere das Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) ermöglicht die Rekrutierung von Monozyten aus dem peripheren Blut, die nach Delokalisation in die Intima in ortsständige Makrophagen umgewandelt werden (Carlos, Harlan, 1990). Besonders symptomatische Karotisstenosen zeichnen sich durch eine erhöhte Oberflächenexprimierung dieser VCAM-1 im Vergleich zu asymptomatischen Stenosen aus (DeGraba et al., 1998).

2.3.1.2.2 Prothrombotischer Zustand

Der zentrale Schritt in der Transformation antithrombotischer (siehe Kap. 2.3.1.1.4) zu den pathologisch bedeutsamen prothrombotischen Eigenschaften der Endothelzelloberfläche ist die Induktion des hochthrombogenen Gewebefaktors (Tissue Factor, TF). Der prokoagulatorische Mechanismus des TF besteht in der Beschleunigung der Faktor VIIa-abhängigen Aktivierung der an der weiteren Gerinnung beteiligten Faktoren X und IX. Besondere Augmentation der Aktivität des TF erfolgt durch eine unter Apoptose auftretende Exposition anionischer Phospholipide (Bombeli et al., 1997).

Die TF-Synthese kann in-vitro durch Anwesenheit verschiedener Agonisten ausgelöst werden. Zu diesen zählen Thrombin, Endotoxin, Hypoxie, oxLDL sowie verschiedene Zytokine (Rapaport, Rao, 1995, Nemerson, 1995). Auch unter dem gleichzeitigen Vorliegen einer Gefäßverletzung sind übermäßige

Konzentrationssteigerungen in der betroffenen Gefäßwand beobachtet worden (Marmur et al., 1993). In atherosklerotischen Plaques ist der Nachweis des Tissue Factors ebenfalls mehrfach gelungen und als pathologischer Begleitzustand zu werten (Hatakeyama et al., 1997). Kommt es zum Kontakt der TF-exprimierenden Endothelzellen mit dem Plasma formieren sich Fibrinbeläge auf den Zelloberflächen (Stern et al., 1985). Das Endothel offeriert den Faktoren IX, IXa, X und Xa sowie Thrombin und Fibrin Bindungsstellen (Brinkman et al., 1994) was die örtliche Ausbildung eines Gerinnsels weiter begünstigt.

Der bislang am besten charakterisierte Bindungsplatz für ein an der Gerinnung beteiligtes Protein ist der Thrombinrezeptor, auch bekannt unter dem Namen Protease Activated Receptor-1 (PAR-1). Bindung von Thrombin mündet in eine Vielzahl von Veränderungen pro- und antithrombotisch wirksamer Moleküle (Cines et al., 1998) sowie in eine Störung interzellulärer Kontakte auf Endothelzebene (Garcia et al., 1995). Zusätzlich wirkt Thrombin mitogen auf SMC, Endothel und Fibroblasten und besitzt chemotaktische Eigenschaften auf Monozyten (Cines et al., 1998), Vorgänge also die einerseits Immunzellen anlocken und zum anderen die Struktur der Gefäßwand modulieren.

Endothelzellen sind mit zusätzlichen Rezeptoren bestückt, die Anteil an der Vermittlung von Gerinnungsprozessen besitzen. Auf die Bindung von Fibrin an die Endothelzelloberfläche ist eine Erhöhung der Leukozytenadhäsion sowie die Inhibition der Synthese des üblicherweise vasodilatatorischen PGI_2 beschrieben (Odrlić et al., 1996). Kultiviertes Endothel exprimiert außerdem Glykoprotein Ib- α (GPIb- α), der den spezifischen Rezeptor des von-Willebrandt-Faktors darstellt. Die Expression von GPIb- α durch Endothel wird unter Anwesenheit von $\text{TNF-}\alpha$ und Interferon- γ verstärkt (Rajagopalan et al., 1992), was nahe legt dass die Präsenz oder Abwesenheit inflammatorischer Stoffe über die Verfügbarkeit der Adhäsionsrezeptoren entscheidet. Diese Vermutungen über die Bedeutung des GPIb- α müssen allerdings mit Hilfe zukünftiger in-vivo Studien konkretisiert werden.

2.3.1.2.3 Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen

Bedingt durch die Minderung der Syntheseleistung der durch einen initialen Stimulus in ihrer Funktion eingeschränkten Endothelzellen entsteht ein Konzentrationsabfall der Syntheseprodukte des Endothels, insbesondere des vasodilatativ wirksamen NO (Clapp et al., 2004). Der Mediator NO stellt normalerweise als potenter Vasodilatator die funktionelle Integrität des Endothels sicher. Das sich durch Minderung des NO ergebende Überwiegen der vasokonstriktorisches Substanzen fördert die lokale Stase und hat die Aggregation von festen Bestandteilen des Blutstroms (z. B. Thrombozyten) zur Folge. Zu der gesteigerten Vasokonstriktion zählt auch eine an glatten Muskelzellen ausgelöste sogenannte „paradoxe“ Vasokonstriktion des Acetylcholins, welches an normalen Endothelien physiologischerweise eine NO-Freisetzung verursacht. Das NO kann im gesunden Zustand neben der vasodilatatorischen Komponente auch der Chemotaxis von Leukozyten entgegenwirken (Barbato, Tzeng, 2004). Geht diese antiinflammatorische Eigenschaft verloren, hat dies die verstärkte Migration inflammatorischer Zellen zur Folge (Sagripanti, Carpi, 2000).

Auch die nach Migration subintimal lokalisierten LDL sind in ihrem späteren oxidierten Stadium (oxLDL) für eine Minderung der vasodilatatorischen Komponente verantwortlich. Dies geschieht auf Basis einer direkten Inhibition der endothelialen NO-Synthase (Mukherjee et al., 2001). Bei Versuchstieren ohne endothelialer NO-Synthase kann experimentell eine ausgeprägte Atherosklerose mit begleitender arterieller Hypertension nachgewiesen werden (Knowles et al., 2000).

2.3.2 Lipoproteinretention

Bereits 1914 gelang Anitschkow der Nachweis, dass durch Ansetzung einer einseitigen, hochdosierten Cholesterindiät bei Versuchstieren hohe Plasmacholesterinwerte zu erreichen sind, die begleitend eine Cholesterinakkumulation innerhalb der Gefäßwände aufweisen. Die Akkumulation von freiem Cholesterin ist in humanen atherosklerotischen Plaques als obligat-pathoanatomischer Zustand anzusehen (Kojda, Harrison, 1999; Rapp et al., 1983).

Studien haben bewiesen, dass eine dauerhafte Hypercholesterinämie zu einer Aktivierung des Endothels in Arterienwänden führt. Durch eine nachfolgende Permeabilitätssteigerung des Endothels können LDL-Moleküle aus dem Blut passiv durch Tight-junction-Zellkontakte diffundieren und so in die Intima migrieren. Infiltration und Retention von LDL in der Intima initiiert auf die Fremdagenzien eine lokale inflammatorische Antwort innerhalb der Gefäßwand (Skalen et al., 2002). Die nachfolgende oxidative Modifikation des LDL durch ROS sowie spezielle Enzyme (Myeloperoxidase, Sphingomyelinase, Phospholipase) führt zur Freisetzung von Phospholipiden, die eine weitere Aktivierung von Endothelzellen forciert (Skalen et al., 2002).

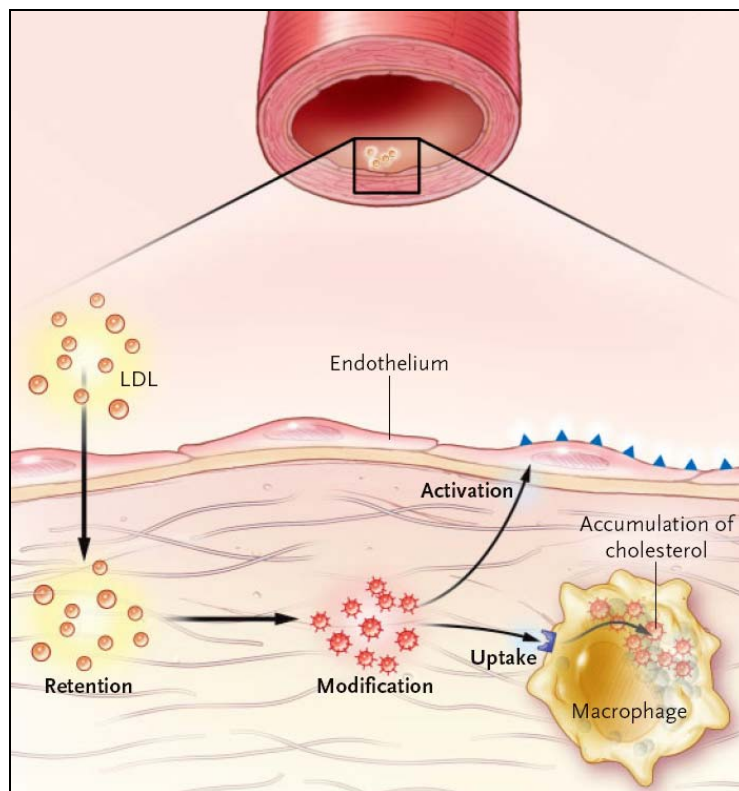


Abbildung 4: Effekt des LDL auf Inflammation

Auf LDL-Infiltration und -Retention folgt nach Umbauprozessen eine Endothelaktivierung, die in die Expression von Adhäsionsmolekülen mündet. (Quelle: Hansson, G. Inflammation, Atherosclerosis and Coronary artery disease. N Engl J Med 2005;352:1687)

2.3.3 Migration von Inflammationszellen

Immunzellen in Form von Monozyten und Makrophagen spielen während sämtlicher Atherogenesestadien eine zentrale Rolle, da deren Nachweis innerhalb einer sich entwickelnden Läsion fortlaufend gelingt (Fuster et al., 1992). Die Anheftung und Infiltration dieser Zellen wird mittels der bereits erwähnten endothelialen Adhäsionsmoleküle (VCAM-1) vermittelt. Differenzierung und Fortbestand der Immunzellen ermöglichen die beiden Stoffe Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) sowie Monocyte Colony Stimulating Factor (M-CSF) in Zusammenspiel mit Interleukinen (Corti et al., 2004).

Nachdem es zur Interaktion zwischen peripheren Monozyten und dem spezifischen VCAM-1 gekommen ist, werden sie durch Chemokine aus der Intima zur Migration in die Gefäßwand stimuliert. VCAM-1 ist von enormer Wichtigkeit im Hinblick auf die weitere Progression einer Plaque, da im Tierversuch auf einen genetisch induzierten Defekt der VCAM-1 eine signifikante Unterbrechung der Plaqueformation durch Reduktion der inflammatorischen Zellmigration beobachtet wurde (Cybulsky et al., 2001). Auch wird vermutet, daß lokal vorkommendes oxidiertes LDL die Expression solcher Adhäsionsmoleküle und der Chemokine beträchtlich fördert (Gimbrone, Jr. et al., 1997).

Insbesondere das aus aktivierten Endothelien stammende Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) zeichnet sich für die gerichtete Migration der Monozyten an Orten späterer fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen verantwortlich (Boring et al., 1998). MCP-1 ist ein in menschlichen und experimentellen Atheromen überexprimiertes Molekül, welches in hohem Maße an der Chemotaxis von Monozyten aus dem Blutstrom beteiligt ist. Signifikante Reduktion atherosklerotischer Veränderungen sind bei Versuchstieren mit MCP-1-Mangel nachgewiesen (Gu et al., 1998). Gleiches trifft auf eine Versuchstierpopulation zu, die einen Mangel des spezifischen MCP-1-Rezeptors CCR-2 vorzuweisen hat (Boring et al., 1998).

2.3.4 Umwandlung zu Makrophagen

Der aus der entzündeten Intima entspringende Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) ist entscheidend für die Differenzierung eingewanderter Monozyten zu Makrophagen, was einen weiteren bedeutenden Schritt des Atheroskroseverlaufs darstellt (Hansson, 2005). Eine Hochregulation der M-CSF-Expression wird bei experimentellen und menschlichen atherosklerotischen Plaques generell beobachtet (Libby, 2002). Die Bedeutung des M-CSF lässt sich aus Tierversuchen ableiten, in denen ein Mangel an M-CSF zu einem deutlichen Rückgang von atherosklerotischen Formationen führte (Smith et al., 1995). Neben der eigentlichen Wirkung auf die steigende Konzentration differenzierter Makrophagen im Plaqueinneren unterstützt der M-CSF zudem die Expression verschiedener Rezeptorengruppen auf der Makrophagenoberfläche.

Scavenger-Rezeptoren (SR-A und CD36) sind imstande, ein breites Spektrum von Molekülen zu erkennen, was Bindung und nachfolgende Phagozytose von oxLDL ermöglicht (Febbraio et al., 2000) (Nicholson, 2004). Diese Ingestion führt zu der Ausbildung von den charakteristischen Schaumzellen. Suzuki et al konnten bei Versuchstieren zeigen, dass eine Ausschaltung von Scavenger-Rezeptoren atherosklerotische Läsionen merklich reduziert (Sakaguchi et al., 1998).

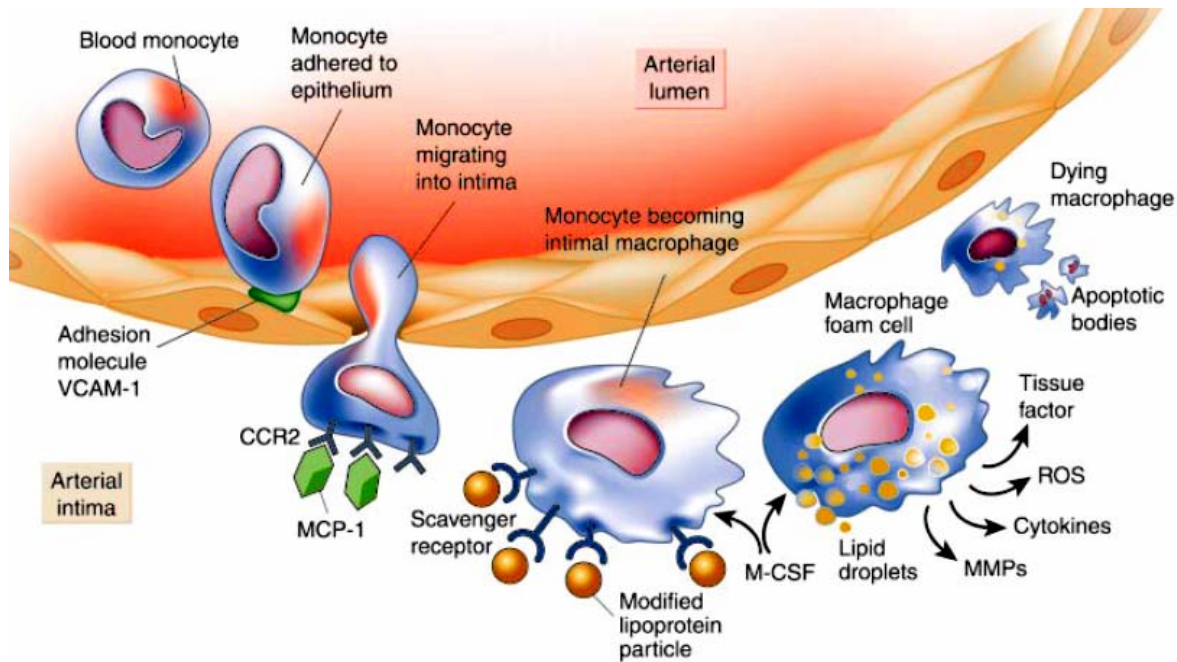


Abbildung 5: Monozytenmigration in die Gefäßwand

Nach Umwandlung in ortsständige Makrophagen entstehen nach Aufnahme von Lipoprotein-Partikeln Schaumzellen. (aus Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002; 420:868-74.)

Sogenannte „toll like receptors“ initiieren eine Signalkaskade, die zur Aktivierung der Makrophagen führt. Die aktivierte Form ist dann in der Lage, inflammatorische Zytokine zu sezernieren und dadurch eine Inflammation im Plaqueinneren zu fördern (Janeway, Jr., Medzhitov, 2002). Die genetische Ausschaltung dieser Rezeptoren hat in abgeschlossenen Studien wiederum atheroprotektive Eigenschaften einer Versuchstierpopulation demonstriert (Bjorkbacka et al., 2004).

2.3.5 Mitwirkung von Mastzellen und T-Zellen

Neben Makrophagen wurde die stetige Anwesenheit weiterer Immunzellen in Form von Mastzellen und T-Zellen beschrieben (Hansson, 2005). Durch Antigenaktivierung in Form von oxLDL produzieren die T-Zellen Zytokine, die vor allem in Form des Interferon- γ Makrophagen stimulieren. Weiterhin steigert das Interferon- γ die Synthese von TNF und Interleukin-1 durch Makrophagen und Endothelzellen (Hansson, 2001), die wiederum ein äußerst proinflammatorisches Milieu aufrechtzuerhalten vermögen.

2.3.6 Schaumzellausbildung

Im Zentrum des Atheroms bilden sich in der Folge der Interaktion zwischen Lipoproteinen und spezifischen Makrophagenrezeptoren nach Phagozytose die bereits erwähnten, typischen Schaumzellen („foam cells“) aus. Ihren Namen verdanken sie ihrer offensichtlich schaumigen Erscheinung unter dem Mikroskop als Resultat einer Fettpartikelakkumulation innerhalb des Zytoplasmas. Die Schaumzelle sezerniert selbst auch Zytokine und unterstützt so ein ohnehin vorherrschendes inflammatorisches Milieu (Linton, Fazio, 2003). Im typischen atherosklerösen Plaque aggregieren diese Zellen in einem zentralen Kern, der von einer Deckplatte glatter Muskelzellen und einer kollagenreichen Matrix umgeben ist. Mit Wachstum dieses Kerns geht eine zunehmende Lumeneinengung des betroffenen Gefäßabschnitts einher. Makrophagen können dann in ihrer Form als Schaumzelle zugrunde gehen; das kontinuierliche Sterben der Schaumzellen im Zentrum der Läsion führt zur Akkumulation von Zelldebris mit freigewordenen Lipidpartikeln. In Folge dessen entsteht eine Trümmerzone, die man als nekrotischen Kern („necrotic core“) bezeichnet (Bjorkerud, Bjorkerud, 1996).

2.4 Mechanismen der Instabilität

Welche verschiedenen Faktoren führen nach den beschriebenen Pathomechanismen der Atherosklerose aber letztendlich zu thrombotischen Komplikationen?

Plaques werden häufig vor einem ischämischen Ereignis als „vulnerabel“ bezeichnet. Derartige Läsionen zeichnen sich durch ein erhöhtes Risiko für die künftige Destabilisierung im Sinne der Ausbildung eines oberflächenassoziierten Thrombus aus.

Naghavi stellte für Koronarplaques erstmals Haupt- und Nebenkriterien auf, die er mit vulnerablen Plaques in Verbindung brachte. Sinn und Zweck war die Einführung einer Terminologie zur Identifikation scheinbar gesunder Individuen, die ein Risiko für künftige Plaquekomplikationen ausweisen. Dieses Risiko ist bei Präsenz eines oder multipler Faktoren der aufgestellten Hauptkriterien oder das Vorhandensein

verschiedener Nebenkriterien gegeben. Zu den Hauptkriterien wurden neben einer aktiven Inflammation des Plaque eine dünne fibrotische Deckplatte, die endotheliale Denudation, eine histologisch erkennbare Fissur sowie eine massive Gefäßstenose gezählt (Naghavi et al., 2003). Nebenkriterien stellen Faktoren auf histologischer Ebene dar.

Welche besonderen Faktoren für die Destabilisierung der Karotisstenose gelten, soll in den nun folgenden Abschnitten zusammengetragen werden.

2.4.1 Thrombusformation nicht an Ruptur gebunden

Die instabile Karotisstenose ist im wesentlichen gekennzeichnet durch eine oberflächenassoziierte luminale Thrombusformation (Lammie et al., 1999; Lammie et al., 2000; Ogata et al., 1987; Sitzer et al., 1995), die die Grundlage für symptomatische Ereignisse bildet. In einem Großteil der Fälle ist diese Thrombose mit einem histologisch sichtbaren Defekt der Gefäßoberfläche assoziiert, den man in der Literatur unter dem Begriff „Ruptur“ oder „Fissur“ beschrieben findet (Carr et al., 1996; Lammie et al., 1999; Lammie et al., 2000; Sitzer et al., 1995; Spencer, 1996). Die Ruptur der bei der fortgeschrittenen Plaque vorhandenen fibrotischen Deckplatte stellt vermutlich die häufigere Ursache einer Thrombusformation dar. Sie konnte bei Koronarthromben in fast 70% der histologisch untersuchten Fälle nachgewiesen werden (Falk et al., 1995). Diese rupuranfälligen Plaques imponieren vor allem durch einen ausgeprägten lipidreichen Kern, einer hohen Dichte an Makrophagen, einer reduzierten Anzahl glatter Muskelzellen sowie einer ausgedünnten fibrotischen Deckplatte (Moreno et al., 1994).

Es existieren jedoch pathoanatomische Hinweise auf eine Thrombusbildung, die nicht gezwungenermaßen an eine begleitende Fissur der Plaqueoberfläche gekoppelt sein muss (Sitzer et al., 1995; Stork et al., 2002). Ein Thrombus auf einer intakten Intima ist in der Literatur in zwischen 29-52% der untersuchten Fälle beobachtet worden. Farb et al identifizierten bei Präparaten von Patienten mit thrombotisch verursachtem, plötzlichem Herztod eine Oberflächenerosion in 30-40% der untersuchten Präparate ohne eine begleitend vorliegende Ruptur (Farb et al.,

1996b). In derartigen Fällen bildet sich der lumenseitige Thrombus auf der lediglich erodierten Plaqueoberfläche aus. Diese epidemiologischen Daten zeigen, dass nicht allein der Nachweis einer Ruptur als einziger Faktor für die Destabilisierung von Karotisstenosen herangezogen werden kann. In der Literatur wird ein möglicher Zusammenhang dieser alternativen Form der Destabilisierung mit Apoptose lumenseitiger Endothelzellen gesehen, die vermutlich so eine lokale Thrombogenitätssteigerung erfahren. Auch in den von uns untersuchten Präparaten sind diese unrupturierten Plaques identifiziert worden (Trostdorf et al., 2007).

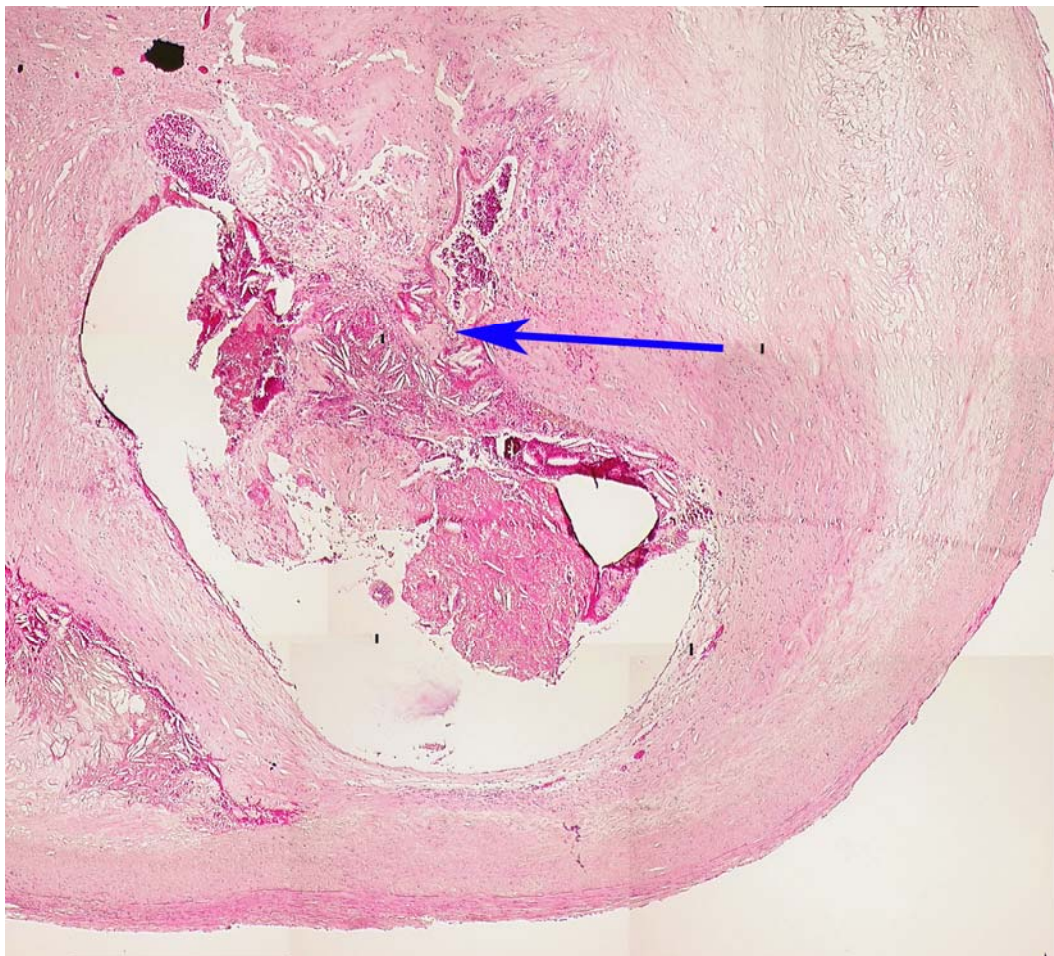


Abbildung 6: Histologie einer Plaqueruptur

Lumen mit sichtbarer Thrombusformation mit Fissur der Gefäßoberfläche (Pfeil), HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung (eigene Quelle).

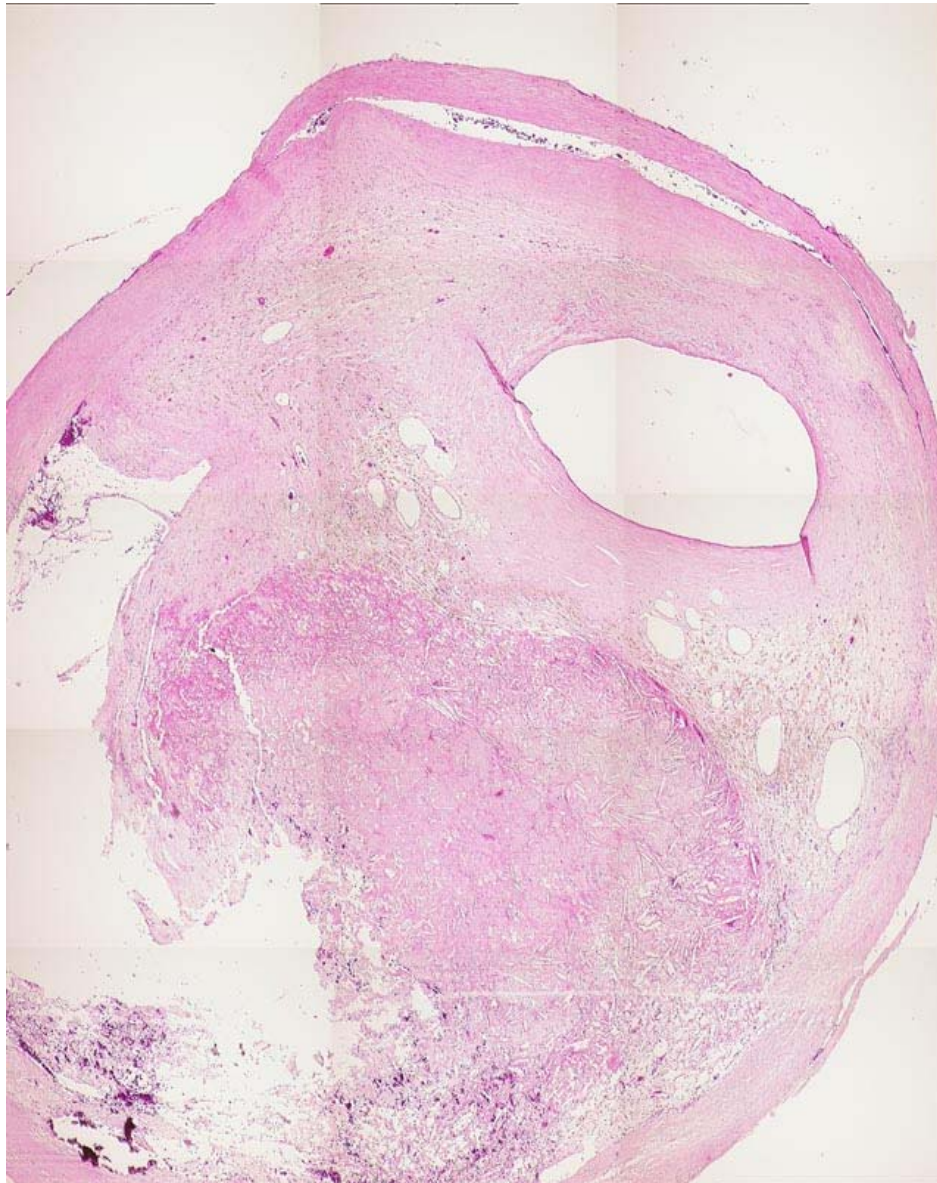


Abbildung 7: Nicht-rupturierter, symptomatischer Karotisplaque

Schnitt eines thrombotischen Plaques; das Bild stellt den maximalen luminalen Querschnitt dar. Eine Fissur wie in Abb. 6 fehlt. (20-fache Vergrößerung, eigene Quelle)

2.4.2 Inflammation

In mehreren Arbeiten wurde bereits der lokalen Inflammation innerhalb eines atheromatösen Karotisplaque herausragende Bedeutung zugesprochen.

Symptomatische Karotisstenosen weisen im Vergleich zu asymptomatischen deutlich erhöhten Entzündungszellen – z.B. Makrophagenpopulationen auf (Jander et al., 1998), die in anderen Studien besonders auf die fibrotische Deckplatte konzentriert scheinen (Bassiouny et al., 1997). Dieser Nachweis gelang bisher sowohl für Koronarplaques (van der Wal et al., 1994) als auch für Plaques der Karotisregion (Carr et al., 1997).

Von hoher Relevanz für die Plaquestabilität erscheint die Präsenz inflammatorischer Zellen in bestimmten Arealen der fibrotischen Deckplatte. Eine Plaquedisruption wird üblicherweise in schwächeren peripheren Regionen der fibrotischen Deckplatte beobachtet, die in der Literatur unter dem Begriff „Schulter“ zusammengefasst werden (Maehara et al., 2002). Hierbei wurden besonders erhöhte Populationen an Inflammationszellen ausgemacht, die wahrscheinlich durch Hemmung der Kollagensynthese zu einer zusätzlichen Schwächung der Stabilität führen.

Die Inflammation im Plaqueinneren wird vor allem durch Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine vermittelt, die in einer atherosklerotischen Formation generell nachweisbar sind (Libby, 2002). Speziell Interleukin-18 (IL-18) konnte in erhöhter Aktivität in symptomatischen Plaques mit begleitender Ruptur der Plaqueoberfläche nachgewiesen werden (Mallat et al., 2001a; Mallat et al., 2001b). Deswegen spielen vermutlich nicht nur die Immunzellen selbst, sondern auch deren Botenstoffe in Form von Zytokinen eine bedeutende Rolle bei der Destabilisierung von atheromatösen Gefäßformationen.

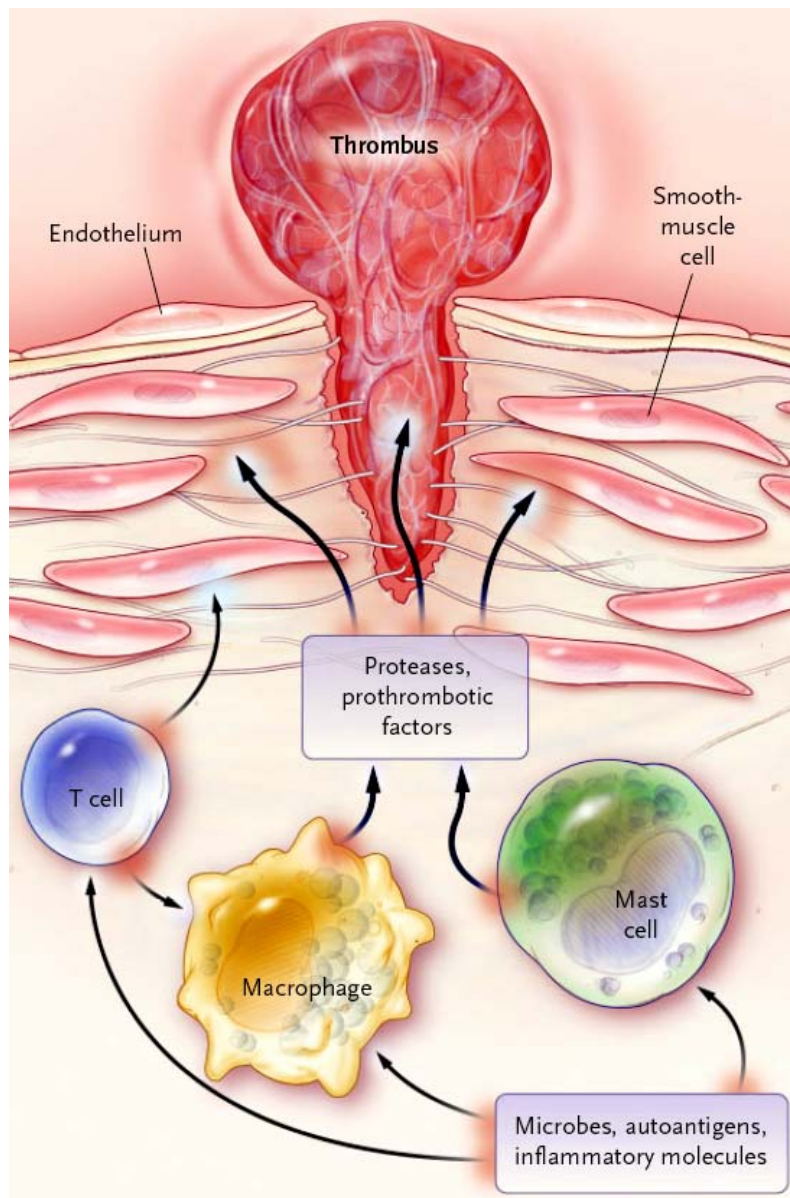


Abbildung 8: Thrombusformation nach Immunzellaktivierung

Von Makrophagen und Mastzellen sezernierte inflammatorische Zytokine führen zu einer zunehmenden Instabilität des Plaques. (Quelle: Hansson, G. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. N Engl J Med 2005; 352: 1685-95)

Neben dem Nachweis von lokalen Entzündungsvorgängen können auch systemische Inflamationsparameter, etwa in Form des C-reaktiven Proteins (CRP), als indirekte Risikofaktoren künftiger zerebral-ischämischer Ereignisse herangezogen werden. Bislang gelang der positive Nachweis einer signifikanten CRP-Erhöhung bei Patienten mit einer vorliegenden symptomatischen Karotisstenose im Vergleich zu einem asymptomatischen Kollektiv, in dem diese CRP-Erhöhung nicht vorlag

(Alvarez et al., 2003). Untersuchungen, die einen prädiktiven Wert des CRP im Hinblick auf künftige zerebrale Ereignisse nachweisen existieren zur Zeit jedoch nicht.

2.4.3 Matrixmetalloproteinasen

Der atherosklerotische Plaque stellt eine dynamische Struktur dar, welche ständigen Umbauvorgängen der Extrazellulärmatrix unterliegt, die letztendlich über die strukturelle Integrität, d.h. Stabilität, der Läsion entscheiden. Im Laufe der Ausbildung eines Atheroms entsteht durch die Formierung des nekrotischen Kerns aus überwiegend abgestorbenen Schaumzellen eine darüber liegende, dem Lumen zugewandte, fibrotische Deckplatte bestehend aus dort eingewanderten und nachfolgend proliferierten glatten Muskelzellen (SMC), deren Anwesenheit physiologischerweise nur auf die Media der Gefäßwand begrenzt ist. Zelluläre Faktoren (TGF- β , PDGF), freigesetzt aus degranulierten Thrombozyten, stimulieren glatte Muskelzellen zur Kollagensynthese. Gegenspieler in Form freigesetzter Zytokine (IFN- γ) aus T-Zellen inhibieren die Synthese dieser extrazellulären Matrix merklich (Amento et al., 1991). Demnach besteht ein Equilibrium zwischen wachstumsauslösenden und wachstumshemmenden Stimuli, die für die Akkumulation der SMC verantwortlich sind. Ein hoher Anteil an SMC innerhalb der Läsion wird mit einer gesteigerten Stabilität der Läsion gleichgesetzt (Trostdorf et al., 2005).

Neben diesem notwendigen Synthesegleichgewicht spielt der Abbau des Kollagens in Bezug auf den Gehalt an extrazellulärer Matrix eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Plaques. Spezialisierte Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteinasen, sind die physiologischen Regulatoren dieser Matrix. Sie vermögen die SMC-Syntheseprodukte (insbesondere Kollagen und Elastin) zu degradieren (Dollery et al., 1995). Im inflammatorischen Milieu des Plaques anwesende Makrophagen schütten die proteolytisch wirksamen Matrixmetalloproteinasen MMP2 und MMP9 aus, die wegen ihres destruierenden Effektes auf Kollagenfasern die Stabilität der Deckplatte beträchtlich herabsetzen können (Galis et al., 1995; Newby, Zaltsman, 1999). Die Expression dieser proteolytischen Enzyme wird durch Anwesenheit inflammatorischer Stimuli (Zytokine) zusätzlich augmentiert (Schonbeck et al., 1997).

Erhöhte Aktivitäten der Metalloproteinasen, die vornehmlich in den Regionen der ausgedünnten Deckplatte lokalisiert sind (Loftus et al., 2000), führen wahrscheinlich auf dem Wege der enzymatischen Degradierung zur Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte und fördern somit die Destabilisierung der Karotisstenose (Alvarez et al., 2004; Molloy et al., 2004).

2.4.4 Neovaskularisierung

Die Neovaskularisierung stellt die innerhalb eines fortgeschrittenen Plaque vermehrt auftretende Angiogenese kleinlumiger Gefäße innerhalb der Intima dar (O'Brien et al., 1994). Obwohl die genauen Mechanismen, die hierzu führen nicht geklärt sind wird von lokal synthetisierten Wachstumsfaktoren wie Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) ausgegangen, die von Entzündungszellen des Plaques sezerniert werden (Brogi et al., 1993). Der Wachstumsfaktor fördert die Ausbildung derartiger Mikrogefäße, die durch ihre fragile Struktur zum einen für das Auftreten von Mikrohämmorrhagien prädisponieren (Kaartinen et al., 1996), zum anderen möglicherweise inflammatorischen Zellen als zusätzliche Eintrittspforte dienen, die für das weitere Plaquewachstum fördernde nutritive Funktion besitzt (Libby, 2002). Symptomatische Karotisstenosen sind bereits mit einer Plaquevaskularisierung mit positivem Nachweis von Intimahämmorrhagien in Zusammenhang gebracht worden (Mofidi et al., 2001).

2.4.5 Plaquethrombogenität

Die ausgeprägte Thrombogenität des nekrotischen Kerns, der bei einer Oberflächenruptur mit dem Blutstrom in Kontakt tritt, ist in erster Linie durch die Anwesenheit des stark thrombogenen Gewebefaktors (engl. „Tissue Factor“=TF) gegeben, der eines der initiierenden Proteine der Gerinnungskaskade darstellt (Toschi et al., 1997). Auf der Zellmembran agierender TF initiiert die Blutgerinnung durch Komplexbindung mit dem plasmatischen Gerinnungsfaktor VII (Prydz, Pettersen, 1988). Der aus dieser Interaktion hervorgehende Komplex aktiviert mittels proteolytischer Aktivität die in der Gerinnungskaskade nachfolgenden Gerinnungsfaktoren IX und X, was letztlich in die Bildung von Faktor IIa (=Thrombin) aus Prothrombin mündet (Pike et al., 1999). Thrombin ist neben seiner Fähigkeit zur

Umwandlung von Fibrin aus Fibrinogen im weiteren an der direkten Thrombozytenaktivierung beteiligt. Begleitend wird via positivem Feedback die Induktion des thrombogenen TF vermittelt.

Während dem Atheroskleroseprozess ist Tissue Factor ein Syntheseprodukt von Makrophagen, begleitend geht daher die vermehrte Makrophagendurchwanderung einer instabilen Plaque daher mit erhöhten Konzentrationen von TF einher (Banfi et al., 2003), die vor allem im Lumen entgegengerichteten Areal nahe des nekrotischen Kerns lokalisiert sind (Jander et al., 2001). Die dort vorherrschenden Immunzellen und deren Mediatoren scheinen direkt mit der Thrombogenität zu korrelieren (Toschi et al., 1997; Carson et al., 1993; Terry, Callahan, 1996). Weiterhin wurde TF in verschiedenen im Plaque vorherrschenden Zellreihen identifiziert. Hierzu zählen neben den genannten Makrophagen auch SMC, Endothelzellen und die umgebende extrazelluläre Matrix (Toschi et al., 1997). Die immense Bedeutung des TF für die Thrombogenitätssteigerung wird deutlich, wenn mittels dessen physiologischen Gegenspieler Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) die Aktivität des TF herabsenkt wird. Badimon et al. kamen zu dem Ergebnis, dass diese Aktivitätsminderung eine signifikante Reduktion der Oberflächenthrombogenität (gemessen anhand der Konzentration radioaktiv markierter Thrombozyten und Fibrinogen) zur Folge hatte (Badimon et al., 1999). Nach einer Plaquedisruption mit Freisetzung dessen Inhalts in den Blutstrom hat der TF also entscheidenden Anteil an der Ausbildung eines akuten Thrombus mit entsprechenden Folgen.

Neben dem bislang bekannten klassischen Dogma der Triggerung der Koagulation durch den direkten Kontakt des freigewordenen TF aus der Gefäßwand gibt es neuerlich Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von zirkulierendem TF an der Ausbildung lokaler Thrombusformationen (Giesen et al., 1999). Giesen et al. erreichten eine Thrombusformation auf TF-freier Schweinemedien, sowie auf TF-freien Glasplatten. Beide Oberflächen wurden lediglich zirkulierendem menschlichen Blut ausgesetzt und anschliessend auf Spuren von TF untersucht. Der erbrachte positive Nachweis des Gewebefaktors auf beiden TF-freien Medien untermauert die Hypothesen auf mögliche Quellen von Tissue-Factor innerhalb des zirkulierenden

Blutvolumens. Erste Hypothesen vermuten Leukozyten, die nach Aktivierung den TF auf ihrer Oberfläche exprimieren.

2.4.6 Infektion

Mehrere Studien konnten in der Vergangenheit eine Verbindung zwischen einer vorliegenden Infektion und Atheroskleroseherden herstellen. Erhöhte Chlamydien-Antikörpertiter wurden bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachgewiesen (Saikku et al., 1988) und aus diesen Beobachtungen entsprangen Spekulationen über eine mögliche ursächliche Beteiligung der Chlamydieninfektion bei der Atheroskleroseentwicklung. Auch im Karotisplaque gelang bereits der direkte Nachweis dieses Erregers (Esposito et al., 1999), jedoch liess sich kein Zusammenhang zwischen einer bestehenden Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* und dem Vorliegen einer instabilen Karotisstenose herstellen (LaBiche et al., 2001). Obwohl im Tierversuch durch eine Chlamydieninfektion keine Atherosklerose ausgelöst oder modifiziert werden konnte (Caligiuri et al., 2001), wird vermutet, dass eine solche Infektion die Progression der Atherosklerose möglicherweise stimulieren und eine Aktivierung einer Plaque fördern könnte. Dies würde vermutlich durch eine lokale Präsenz der Erreger im Plaque gelingen, die als Katalysator der T-Zell vermittelten Inflamationsprozesse im Plaqueinneren dienen. Zu diesem Ergebnis kamen Nadareishvili et al durch positiven Nachweis von T-Zell-Subtypen und gleichzeitigem Vorliegen erhöhter T-Lymphozytenzahlen in einer symptomatischen *Chlamydia pneumoniae* positiven Karotisstenose (Nadareishvili et al., 2001).

In Form einer systemischen Infektion wäre ein Einfluss auf atherosklerotische Läsionen ebenfalls denkbar, was in Form zirkulierender inflammatorischer Mediatoren zu erklären wäre (Kalayoglu et al., 2002).

Der Faktor einer bestehenden Infektion (z. B. durch Chlamydien) bei der Plaquestabilisierung muss demnach durch weitere Studien konkretisiert werden.

2.4.7 Programmierter Zelltod (Apoptose)

Schließlich wird dem Prozess des programmierten Zelltods eine – vermutlich hochbedeutsame - Bedeutung bei der Destabilisierung atherosklerotischer Plaques zugesprochen. Prädisposition zur Apoptose kann durch eine Vielzahl von intra- und extrazellulären Signalen determiniert werden.

Extrazelluläre Faktoren, die für Apoptose bei verschiedenen im Plaque vorherrschenden Zellreihen verantwortlich gemacht werden, sind bereits identifiziert worden (Bauriedel et al., 1999; Bjorkerud, Bjorkerud, 1996; Geng, Libby, 1995). Die exaktere Charakterisierung dieser Faktoren und ihr genauer Stellenwert in Bezug auf die Signaltransduktion der Apoptose in-vivo muss jedoch weiter untersucht werden. Dies gestaltet sich häufig schwierig, da oftmals pro- und anti-apoptotische Faktoren aus identischen Zellreihen entspringen und gleichzeitig vorliegen.

Unabhängig von potentiellen Auslösern fördert Apoptose die Prozesse Inflammation, Thrombusformation und Plaqueruptur, die allesamt dem Stadium fortgeschrittener Atheroskleroseformationen zugehörig sind. Die Darstellung der Bedeutung der Apoptose für den Plaque soll im folgenden konkretisiert werden.

2.5 Allgemeine Bemerkungen zur Apoptose

Der biologische Begriff der Apoptose („programmierter Zelltod“) beschreibt den Ablauf des morphologisch stereotypen „Zellselbstmord“, der in multizellulären Organismen stets physiologisch allgegenwärtig ist und einen besonders fein-regulierten, aktiven Prozess darstellt. Dieser Vorgang ist von fundamenteller Bedeutung für die Entwicklung multizellulärer Organismen und ermöglicht die Elimination einzelner Zellen aus dem vitalen Gewebsverband, was für eine kontinuierliche Erneuerung des Gewebes unabdingbare Voraussetzung ist.

Schon bei der erstmaligen Beschreibung der Apoptose wurde diese Form des Zelltods morphologisch von der Nekrose unterschieden (Kerr et al., 1972). Im Gegensatz zu Zellorganellenschwellung und Membrandesintegration, die pathomorphologische Korrelate der Nekrose darstellen, sind die Faktoren Zellmembranschrumpfung, Chromatinkondensation, Zellfragmentation, Ausbildung

von Pseudopodien und Kernfragmentation die wesentlichen histologischen Kriterien der Apoptosereaktion (Wyllie, 1980). Durch Phagozytose ohne eine parallel ablaufende Entzündungsreaktion (die wiederum nur bei der Nekrose beobachtet wird) kommt es zur Entfernung übrig gebliebener apoptotischer Reste (Körperchen) ohne Zerstörung der umliegenden Gewebsarchitektur (Fadok et al., 1992).

Sämtliche Zellen des Körpers besitzen die für den Ablauf apoptotischer Prozesse notwendigen Komponenten. Essentiell hierbei ist das Ineinandergreifen zellulärer „Überlebensfaktoren“ sowie proapoptotischer Faktoren in Form einer komplexen Signaltransduktion.

2.5.1 Rolle der Caspasen

Üblicherweise ist das Gewebe in der Lage, apoptotische Vorgänge eigenständig zu regulieren und auf diese Weise ein Gleichgewicht an zellulärem Durchsatz aufrechtzuerhalten (Bellamy et al., 1995). Erst in den frühen 80er Jahren gelangen die ersten biochemischen Nachweise für den Ablauf apoptotischer Vorgänge. Seither hat man elf verschiedenen spezifischen zellulären Polypeptiden, den sogenannten Caspasen, eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Durchführung der Apoptose beigemessen (Lazebnik et al., 1993; Kaufmann, Hengartner, 2001). Die Caspasen sind stets in ihrer inaktiven Form als Proenzyme in der Zelle präsent. Nach Aktivierung der Caspasen folgt die Spaltung bestimmter, für das Zellüberleben verantwortliche, intrazellulärer Proteine, was den Beginn des Apoptoseprozess darstellt.

Trotz bislang nicht vollständig entschlüsselten Einzelschritten existieren grundsätzlich zwei Pfade, die zelluläre Apoptose regulieren. Ein Pfad vollzieht sich auf der Ebene von Membranrezeptoren, der andere auf mitochondrialer Ebene. Als Endschritt ist den beiden Pfaden gemeinsam die Aktivierung der terminalen Effektorcaspasen.

2.5.2 Extrinsischer Pfad („Death-receptor pathway“)

Der extrinsische Pfad nutzt einen membrangebundenen Rezeptor, der als „Death-Rezeptor“ oder auch „Fas“ bezeichnet wird. Nach Bindung von Fas-Ligand führt die Rezeptoraktivierung zur Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-Associated-Death-Domain). Die Anwesenheit von FADD aktiviert intrazelluläre Caspasen (8 und 9), die dann im weiteren Verlauf terminale Caspasen (3,6, und 7) aktivieren und so zur Initiation des Apoptosevorgangs führen (Ashkenazi, Dixit, 1998). Die aktivierte Caspase 8 stellt außerdem eine Verbindung zu dem intrinsischen Pfad her, indem sie pro-apoptotische Moleküle der Bcl-2-Familie exprimiert, die nachfolgend die Cytochrom-c Freisetzung (Vgl. 2.5.3) stimulieren.

Da die Expressierung des o. g. „Death receptors“ der entscheidende Schritt des extrinsischen Pfads darstellt, ist dieser auch unter dem Namen „Death-Receptor Pathway“ beschrieben worden.

2.5.3 Intrinsischer Pfad („mitochondrial pathway“)

Der zweite Pfad ist von der Rezeptorenaktivierung auf der Zelloberfläche unabhängig. Dieser intrinsische Signalweg beginnt mit der Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c, welches zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Obwohl sämtliche Trigger für die Cytochromfreisetzung nicht hinreichend identifiziert sind wird diese von der relativen Aktivität des protoonkogenes Bcl-2 vermittelt (Littlewood, Bennett, 2003). Das austretende Cytochrom c aus den Mitochondrien aktiviert im Zytoplasma die pro-Caspase 9, die selbst wiederum nachfolgende Caspasen aktiviert (Kockx et al., 1998b). Der Prozess endet schliesslich in der Degradierung der Zelle, wobei der entscheidende Prozess der DNA-Fragmentation letztendlich zu irreversiblen Verlust der Zellintegrität führt (Enari et al., 1998). Die Zellreste, die lediglich in Form apoptotischer Körperchen zurückbleiben, werden nach Erkennung durch spezifische Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche abgeräumt (Fadok et al., 1998b). Die Freisetzung des Cytochrom-c stellt bei dem intrinsischen Pfad das auslösende Ereignis für die weitere Caspasenaktivierung dar. Daher leitet sich für den intrinsischen Pfad der alternative Name „mitochondrial pathway“ ab.

2.6 Bedeutung der Apoptose für atherosklerotische Plaques

Prinzipiell können Apoptosevorgänge während der gesamten Atherogenese ausgemacht werden (Rossig et al., 2001). Die nachfolgende Tabelle fasst zunächst einzelne Apoptoseprozesse in Verbindung mit entsprechend bekannten histopathologischen Veränderungen zusammen:

	<i>Histopathologisches Ereignis</i>	<i>Rolle der Apoptose</i>
1	Initiale Endothelverletzung	Endothelaktivierung u. a. durch Zytokine, Induktion von EC-Apoptose und nachfolgende Dysfunktion
2	Proliferation	SMC-Proliferation →Apoptose
3	Plaqueeentwicklung	SMC-Apoptose →Makrophagenmigration (durch MCP-1)
4	Destabilisierung	SMC-Apoptose →Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte
5	Ruptur / Erosion	EC-Apoptose →Erosion (=Trigger für Plaqueruptur?)
6	Luminale Thrombusformation	Förderung durch Funktionsverlust apoptotischer Endothelzellen

Tabelle 5: Histopathologie und Rolle der Apoptose bei Atherosklerose

(modifiziert nach: Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. Basic Res Cardiol. 2001;96:11-22.)

2.6.1 Mehrere Zellreihen betroffen

Obwohl weitgehend Unklarheit darüber herrscht, welchen genauen Stellenwert die Apoptose bei der Destabilisierung einer atherosklerotischen Läsion einnimmt, besteht Übereinstimmung darüber, dass verschiedene Zellreihen innerhalb des atherosklerotischen Plaque von Apoptose betroffen sind (Kockx, Herman, 1998; Kockx, Herman, 2000). Für Auswirkungen der Apoptoseprozesse wird besonderes Augenmerk den Endothelzellen, den glatten Muskelzellen sowie den Makrophagen

gewidmet, die das Apoptoseprogramm als Antwort auf bestimmte im Plaque bestehende Stimuli durchlaufen. Höchste apoptotische Aktivität konnte bislang den Makrophagen nachgewiesen werden (Kockx, 1998). Lutgens gelang es weiterhin eine Beziehung zwischen dem vermehrten Nachweis apoptotischer Zellen im Plaque und dem progressiven Fortschreiten des Plaquestadiums herzustellen (Lutgens et al., 1999a), was einen kausalen Zusammenhang dieser Faktoren nahelegt.

2.6.1.1 Apoptosen glatter Muskelzellen

Der Nachweis apoptotischer SMC in atherosklerotischen Plaques der ACl sowie der Koronarien ist in verschiedenen Studien mehrfach erfolgt (Geng, Libby, 1995; Han et al., 1995; Isner et al., 1995; Jovinge et al., 1997; Kockx et al., 1998a). Während der Wachstumsphase eines Plaque werden glatte Muskelzellen (SMC) der Gefäßwand durch die Anwesenheit inflammatorischer Mediatoren zur Migration und Proliferation innerhalb der Intima stimuliert und produzieren dort den überwiegenden Anteil der im Plaque enthaltenen extrazellulären Matrix, welche sich insbesondere aus Kollagen, Elastin und einer Reihe von Proteoglykanen zusammensetzt (Campbell et al., 1988). Zytokine können die Synthese des Kollagens stimulieren (Amento et al., 1991). Gemeinsam mit interstitiellen Kollagenfasern sorgen die SMC für Stabilität der fibrotischen Deckplatte.

Die Apoptose der vaskulären SMC wird durch Faktoren ausgelöst, die auch bei anderen Zellreihen (Endothel, Makrophagen) apoptoseinduzierenden Einfluss besitzen. Neben der Rolle erhöhter subintimaler oxLDL-Spiegel (Taguchi et al., 2000) sind externe mechanische Kräfte aufgrund veränderten Blutflusseigenschaften mit einem vermehrten Aufkommen von apoptotischen SMC beobachtet worden (Berceli et al., 2002).

Eine Plaqueruptur wird durch verschiedene Stressoren erleichtert, die vor allem in einer Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte gesehen wird. Die von Makrophagen freigesetzten Matrixmetalloproteinasen schwächen durch Degradierung umliegender Kollagenfasern die fibrotische Deckplatte (Galis et al., 1994). In Folge des Verlusts stabilisierender SMC geht ein weiteres Maß an Stabilität verloren, da apoptotische

SMC nicht mehr imstande sind Kollagen durch eine ausreichende Biosynthese bereitzustellen (Kockx, Knaapen, 2000). Da es sich bei den Schulterregionen der fibrotischen Deckplatte bewiesenermassen am ehesten um Lokalisationen einer Ruptur handelt (Geng, Libby, 1995) und dort begleitend erhöhte SMC-Apoptosenraten nachgewiesen wurden liegt die Vermutung nahe, dass das dort vorherrschende Zugrundegehenden glatter Muskelzellen besonders zur Destabilisierung des Plaque beiträgt (Libby et al., 1997).

Für Koronarien gelang bereits der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen erhöhten SMC-Apoptosenraten und dem begleitenden Vorliegen einer instabilen Plaque (Bauriedel et al., 1999; Kolodgie et al., 2000). Auch für die symptomatische Karotisstenose existieren Untersuchungen, in denen ein erhöhter Prozentsatz von Apoptosen glatter Muskelzellen gegenüber asymptomatischen Plaques nachgewiesen werden konnte (5% vs 1%). Vergleichbare Ergebnisse wurden für rupturierte Plaques in Gegenüberstellung zu intakten Plaqueoberflächen ermittelt (Bassiouny et al., 1997; Carr et al., 1996).

Weiterhin sind apoptotische SMC in der Lage, die Plaquethrombogenität zu fördern. Dieses Phänomen begründet sich aus deren gesteigerten Thrombinsynthese unter Apoptose (Flynn et al., 1997). Auch bei den SMC kommt es zur Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche im Frühstadium des programmierten Zelltods (Stuart et al., 1998). Dieses Merkmal teilen sich apoptotische SMC mit apoptotischen Endothelzellen und Makrophagen. PS ist unter der gleichzeitigen Präsenz der Gerinnungsfaktoren V und VII in der Lage als Substrat für die Thrombingeneration zu dienen. In atherosklerotischen Plaques steigt also durch Apoptose glatter Muskelzellen - neben einer möglichen Ruptur durch Stabilitätsschwächung – die Chance einer Thrombusformation.

2.6.1.2 Apoptosen von Makrophagen

Trotz des positiven Nachweises apoptotischer Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen sind die wesentlichen Faktoren, die den programmierten Zelltod bei dieser Zellreihe auslösen noch unbekannt (Littlewood, Bennett, 2003). Dennoch gelang der Nachweis der örtlichen Beziehung von apoptotischen Makrophagenpopulationen zu

rupturierten Plaquearealen (Kolodgie et al., 2000), die eine Rolle dieser Zellreihe bei der Destabilisierung implizieren.

Zahlreiche in-vitro Studien haben den oxidierten Lipiden und bestimmten Zytokinen eine mögliche kausale Beteiligung bei der Makrophagenapoptose zuteil werden lassen. Veränderte Lipide, so auch oxLDL, sind in der Lage bei allen Zellreihen einer atherosklerotischen Läsion Apoptosevorgänge auszulösen, im speziellen auch bei Makrophagen (Li et al., 2002; Salvayre et al., 2002). Außerdem kann IFN- γ , ein von T-Helfer Lymphozyten sezerniertes Zytokin, sowohl die Expression von MCP-1 fördern und Apoptose von (menschlichen THP-1) Makrophagen induzieren (Inagaki et al., 2002). Unter Anwendung von TNF- α -Antikörpern gelingt die Inhibition dieser IFN- γ induzierten Apoptose der Makrophagen, was die Rolle dieses Zytokins bei der Vermittlung des Apoptoseprozesses nahe legt.

Hypothetische Ansätze existieren für die Auswirkungen der Apoptose bei Makrophagenpopulationen auf die Plaquestabilität: einerseits könnten erhöhte Makrophagenkonzentrationen an Orten mit nachgewiesener Plaqueruptur für eine Beteiligung der Makrophagen bei der Destabilisierung der Plaque sprechen (Kolodgie et al., 2000). Ob jedoch die Makrophagenapoptose ursächlich für die Ruptur anzusehen ist oder sich als Antwort darauf vollzieht ist nicht bekannt.

Auf der anderen Seite sind die Makrophagen für einen Anteil des Kollagenabbaus verantwortlich, da sie die dafür notwendigen Matrixmetalloproteinasen freisetzen. Verlust an plaqueständigen Makrophagen durch Apoptose würde demnach zu einer Minderung der Matrixmetalloproteinasen führen und einen verminderten Kollagenabbau nach sich ziehen. Daraus liesse sich eine positive Stabilisierung der Plaque ableiten und das Risiko einer nachfolgenden Oberflächenruptur scheint somit vermindert (Littlewood, Bennett, 2003).

Während man der Apoptose von SMC und Endothelien bestimmte Folgen für einen Plaque zuordnen kann, bleibt die genaue Bedeutung der Apoptosen der Makrophagen für die weitere Plaqueprogression zum derzeitigen Zeitpunkt unklar.

2.6.1.3 Apoptosen vaskulärer Endothelzellen

Endothelzellen agieren neben ihrem in 2.3.1.1 dargestellten breiten Spektrum besonders als funktionelle Barriere gegen die lokale Bildung eines luminalen Blutgerinnsels. Die Apoptose von Endothelzellen geht mit dem Verlust dieser Schutzfunktion einher und scheint demnach einen initialen Mechanismus für den Atherogeneseprozess darzustellen. In Bezug auf die viel diskutierte „response to injury“-Hypothese, bei der man von einer initialen Störung der Endothelzellen ausgeht, die in eine nachfolgende Migration von Lipiden und Inflammationszellen in die Gefäßwand mündet, könnte die Apoptose hierbei den entscheidenden Erklärungsansatz darstellen.

Obwohl noch nicht eindeutig geklärt ist, in welchem Ausmass apoptotischer Endothelzelltod in vivo überhaupt auftritt, existiert wachsende Beweislage für das Vorhandensein erhöhter Endothelzellapoptosenraten innerhalb atherosklerotisch veränderter Gefäßabschnitte (Tricot et al., 2000). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an okkludierten oberflächlichen Venen der unteren Extremität zeigten erstmals histopathologische Veränderungen im Sinne von einer abnormen endothelialen Zellstruktur, die mit erweiterten interzellulären Kontakten einhergingen. Diese Veränderungen suggerierten das Vorhandensein apoptotischen Zellsterbens (Kockx et al., 1994). Später gelang die Induktion von endothelialer Apoptose in Rattenaorta durch die Administration von Lipopolysacchariden (Hansson et al., 1985). Weitere in-vitro Methoden zur Initiation von Apoptose bei Gefässendothelien existieren und stellen eine Verbindung zwischen Stimulus und der Apoptose her (Polunovsky et al., 1994; Buchman et al., 1993; Eissner et al., 1995).

Der erste Effekt von Apoptose luminaler Endothelzellen betrifft die Augmentation lokaler Inflammation und beginnt mit der Rekrutierung von Inflammationszellen aus dem Blutstrom. Apoptotische Endothelien stülpen Teile ihrer Zellmembran aus, die unter der Bezeichnung „apoptotic blebs“ beschrieben sind. Diese Membranteile sind auf Plaqueoberflächen stets vorhanden (Mallat et al., 1999b) und stimulieren Endothelzellen zirkulierende Monozyten zu binden (Huber et al., 2002), was eines der frühen Ereignisse der Atherosklerose darstellt (Ross, 1999). Die Infiltration der

Gefäßwand mit Inflammationszellen stellt eines der Frühereignisse der Atherosklerose dar und kann als Folge von Apoptoseprozessen angesehen werden.

Wichtige Auswirkungen der Endothelzellapoptose auf Gerinnungsebene ergaben sich aus Studien Ende der 90er Jahre. Durand et al gelang durch artifizieller in-vivo Induktion von Apoptose bei Tierendothelzellen mittels Staurosporin eine histologisch signifikant vermehrte erfassbare Thrombusformation in 58% der untersuchten Präparate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Durand et al., 2004). Parallel dazu wurde eine deutliche Ablösung der Endothelien aus dem lumenseitigen Zellverband beschrieben („Denudation“), die in der Kontrollgruppe ohne Apoptosen völlig abwesend war. Die für den Nachweis von Apoptosevorgängen herangezogene TUNEL-Färbung konnte besonders bei Endothelien an der Bindungsstelle zwischen formiertem Thrombus und der Gefäßwand beobachtet werden, was eine Beziehung zwischen der induzierten Apoptose und der Thrombusformation nahe legt. Diese Studie ist eine der ersten Hinweise auf eine mögliche bedeutende Rolle der Apoptose der Endothelzellen für die Thrombogenitätssteigerung einer atherosklerotischen Läsion.

Weiterhin gingen Bombeli und Mitarbeiter dem direkten Zusammenwirken zwischen endotheliale Zelltod und einer möglicher Korrelation zur Ausbildung eines prothrombotischen Zustands von aus Nabelvenen stammenden Endothelzellen nach (Bombeli et al., 1997). Apoptose wurde in der Versuchsreihe artifiziell unter Verwendung von Staurosporin induziert. Neben der für Apoptosevorgänge typischen Oberflächenexpression von Phosphatidylserin (Blankenberg et al., 1998) konnte eine vermehrte Aktivität des prokoagulatorischen TF dokumentiert werden. Die Erhöhung von TF vollzieht sich also zum einen unter Anwesenheit inflammatorischer Zellreihen jedoch darüber hinaus auch direkt durch endotheliale Apoptosevorgänge, die die funktionelle Aktivität von TF auf bislang unbekannte Weise erhöhen. Zusätzlich dokumentierten Bombeli et al nach 8 Stunden den Verlust von Membraneigenschaften, die durch den Verlust an intrazellulärem und membrangebundenem TFPI, einer lokalen Konzentrationsminderung von Heparansulfat und der zeitabhängigen Minderung des Thrombomodulins charakterisiert waren, allesamt Substanzen mit einer antithrombotischen

Wirkkomponente. Die Autoren beschrieben parallel dazu eine auf den apoptotischen Zellen um das 5-fache gesteigerte Bindung von Thrombin im Vergleich zu normalen Endothelien, was wiederum das Auftreten eines Thrombus begünstigt (Bombeli et al., 1999).

In einer aktuelleren Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnten die prothrombotischen Eigenschaften apoptotischer Endothelien noch weiter charakterisiert werden: es konnte gezeigt werden, dass die künstliche Apoptoseninduktion eine vermehrte Bindung von Thrombozyten an die Oberfläche des Endothels zur Folge hat, was in der Studie thrombotische Ereignisse unterstützte (Bombeli et al., 1999). Die Aktivierung der gebundenen Thrombozyten rekrutiert weitere zirkulierende Blutplättchen und bildet schliesslich stetig wachsende Aggregate. Aus diesen Ergebnissen der Bombeli-Arbeitsgruppe lässt sich eine effektive Beteiligung des apoptotischen Endothels bei der Ausbildung eines prothrombotischen Oberflächenmilieus ableiten.

Interessanterweise bleibt das prokoagulatorische Potential apoptotischer Zellen nicht lokal auf den atherosklerotischen Plaque beschränkt: bereits vor Jahren wiesen Hladovec et al zirkulierende endotheliale Zellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit begleitender Hypertension und Angina pectoris nach (Hladovec et al., 1978; Hladovec, Prerovsky, 1989). Dieser Nachweis legt bei diesen Kreislauferkrankungen ein massives Zugrundegehen von Endothelzellen mit folgender Aussaat in die Blutbahn nahe.

Auch Tedgui et al propagieren solche „systemischen Effekte“ des apoptotischen Endothels: sie postulieren, dass abgestorbene Zellen beim gleichzeitigen Vorliegen einer Plaqueruptur in das zirkulierende Blut embolisieren und dort eindeutig als apoptotische Zellpopulationen ausfindig zu machen sind (Topol, Yadav, 2000). Selbst bei völliger Abwesenheit eines morphologischen Defekts der luminalen Gefäßwand könnte apoptotisches Endothel, nach Ablösung aus dem Zellverband, in die Blutzirkulation gelangen und den oberflächenständigen und hochthrombogenen Gewebsfaktor mitsamt anhaftenden aktivierten Zellen und Thrombozyten in das periphere Blut tragen (Jude et al., 1994; Gawaz et al., 1996). Damit verbunden ginge

eine systemisch gesteigerte Thrombogenitätssteigerung einher (Mallat, Tedgui, 2001).

Für Koronarplaques konnte man zirkulierende phosphatidylserinbeladene Mikropartikel - vorwiegend endothelialer Herkunft - aus dem peripheren Blut von ACS-Patienten isolieren (Mutin et al., 1999), die bei diesem Kollektiv in höherer Konzentration im Vergleich zu stabilen Koronarpatienten vorlagen. Unter der Berücksichtigung der Expression von Phosphatidylserin (Vgl. 2.6.3) unter Apoptose weist dies auf eine systemische Beteiligung apoptotischer Zellen während des Atheroskleroseprozesses hin (Mallat et al., 2000). Zusätzlich liessen sich in-vitro bereits Nabelvenenendothelapoptosen durch Inkubation mit Seren von ACS-Patienten induzieren, was vermutlich ebenfalls auf die Existenz zirkulierender pro-apoptotischer Faktoren zurückzuführen ist, die den Krankheitsprozess nicht nur lokal beschränken (Valgimigli et al., 2003a). Der Focus auf eine einzelne instabile Läsion mag daher nicht plausibel erscheinen obgleich es zu prüfen gilt ob auch speziell Karotisplaques hiervon betroffen sind. Für Karotisstenosen speziell existieren momentan keine Daten über apoptotische Serummarker, die den lokalen Atherogeneseprozess in die Blutbahn ausschwemmen und sich daraus ergebende Folge im Sinne klinischer Symptomatik.

Zusammengefasst kann also davon ausgegangen werden, dass die initiale endotheliale Dysfunktion eine Thrombusformation begünstigt, die sich nach den genannten Erkenntnissen auch ohne eine gleichzeitig vorhandene Ruptur ausbilden kann. Deswegen muss die Störung auf Endothelebene in Form der Apoptose als Schlüsselrolle für nachfolgende atherothrombotische Komplikationen angesehen werden.

2.6.2 Co-Lokalisation zu Inflammation

Apoptose und Inflammation scheinen zwei eng verknüpfte Prozesse darzustellen. Die im nekrotischen Kern vorherrschenden Inflammationszellen sind in enger Nachbarschaft zu apoptotischen Zellen nachgewiesen worden (Mallat et al., 1999a). Apoptose scheint hier von verschiedenen inflammatorischen Mediatoren vermittelt zu

werden. Speziell inflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ (Michowitz et al., 2005) und Interferon γ (Inagaki et al., 2002) konnte die Fähigkeit nachgewiesen werden, Apoptosevorgänge zu initiieren. Aus dieser Feststellung begründet sich die Annahme, dass eine fortlaufende Akkumulation inflammatorischer Zellen innerhalb einer Plaque additiv zur Initiation von Apoptose beiträgt.

Neben der Wirkung inflammatorischer Zytokine können auch in die Intima eingewanderte Mastzellen (Makrophagen und T-Lymphozyten) an der Hochregulierung von Apoptoseprozessen beteiligt sein. Dies trifft beispielsweise auf eine Steigerung der SMC-Apoptoserate als Folge einer gesteigerten Chymase-Freisetzung durch Mastzellen zu (Leskinen et al., 2001).

Die Amplifikation der Immunantwort kann wiederum durch Membranvesikel apoptotischer Zellen erfolgen. Diese unter Apoptose freigesetzten Vesikel sind in der Lage, durch Freisetzung oxidierter Phospholipide eine luminale Monozytenadhäsion an das Endothel zu fördern (Huber et al., 2002), was die konsekutiv gesteigerte Monozytenmigration in subendotheliale Schichten zur Folge hat. Die lokale Abräumreaktion von Resten des Apoptoseprozesses (sog. apoptotische Körperchen) gelingt durch Makrophagen und wird durch die Expression von Phosphatidylserin (PS) auf der von Apoptose betroffenen Zelloberflächen vermittelt. Das PS führt zur Aktivierung benachbarter Mastzellen, was eine Steigerung der Phagozytoseaktivität zur Folge hat (Fadok et al., 1998a).

2.6.3 Prokoagulatorisches Potential

Mittlerweile wurde bewiesen, dass die Apoptose von Endothelzellen mit einer vermehrten Expression von exoplasmatischem, membranständigem Phosphatidylserin (PS) einhergeht (Bombeli et al., 1997). Dieser Zustand scheint auf effiziente Weise verschiedene Gerinnungsfaktoren zu aktivieren. Infolgedessen induziert Apoptose ein prokoagulatorisches Verhalten wie es auch bei aktivierten Thrombozyten beobachtet wird.

Apoptotische Zellen nehmen jedoch eine weitere bedeutsame Eigenschaft an, die in der gesteigerten Aktivität des Gewebefaktors (TF) liegt (Greeno et al., 1996). Zu

diesem Ergebnis kamen Greeno et al durch in-vitro Induktion von Apoptose an kultivierten Endothelzellen mit nachfolgender Dokumentation der TF-Aktivität. Die Daten legen eine Assoziation zwischen Apoptose und der Expression von zelloberflächlichem TF nahe und deuten auf eine Amplifikation prokoagulatorischer Eigenschaften unter einer gesteigerten Apoptoserate im Plaque hin.

Der Nachweis des Tissue Factors konnte vor allem in Arealen des nekrotischen Kerns fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques gelingen (Toschi et al., 1997). Mallat et al lokalisierten den TF innerhalb apoptotischer Zellreihen (Mallat et al., 1999b). Untersuchungen von Moreno et al. zeigten eine Koloalisation des Gewebefaktors mit apoptotischen Makrophagen (Moreno et al., 1996). Tedgui wiederum benannte als bedeutsame Quelle für TF die Mikropartikel apoptotischer SMC (Tedgui, Mallat, 2000). Weitere Daten lassen auf erhöhte Konzentrationen von TF und PS innerhalb der aus Apoptose hervorgegangenen Mikropartikeln schliessen. Sie scheinen sogar den Hauptanteil der TF-Gesamtkonzentration im gesamten Plaque beizusteuern, was einen kausalen Zusammenhang zwischen der absoluten Mikropartikelpräsenz und der daraus resultierenden Steigerung der Plaquethrombogenität nahelegt. Weiterhin können Mikropartikel an Orten mit histologisch nachgewiesener Plaqueruptur in vermehrter Population nachgewiesen werden, was eine zunehmende Plaqueinstabilität theoretisch zu begründen scheint (van der Wal et al., 1994).

Zusätzlich zur Rolle des Gewebefaktors als Ursache prothrombotischer Eigenschaften könnte auch der direkte Kontakt des Blutstroms mit subintimalen Zellstrukturen zu einer Auflagerung von Gerinnseln führen. Da die Zellretraktion und der Verlust von interzellulären Kontakten zwei Merkmale des Apoptosevorgangs darstellen (Bellamy et al., 1995) wird angenommen, dass Areale mit nachweisbar hohen Raten an apoptotischen Endothelzellen beträchtliche Bereiche der subendothelialen prokoagulatorischen Matrix freilegen. Bombeli et al konnten eine Zunahme an luminaler Kollagenfreilegung in den ersten 6 Stunden nach Apoptoseinduktion beobachten, die eine auf dieser Oberfläche mögliche Thrombinformation dramatisch begünstigt (Bombeli et al., 1997). Dieser prokoagulatorische Effekt ist analog zu einer früheren Studie, in der gezeigt werden

konnte, dass die physiologischen antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels durch Freilegung von Kollagen deutlich reduziert sind (Bombeli et al., 1996).

2.6.4 Relation zum Blutfluss

Hämodynamischer und mechanischer Stress auf die Gefäßwand entsteht zum einen durch die physiologisch bestehenden Kräfte des systemischen Blutdrucks, zum anderen durch lokale Eigenheiten des Blutflusses. So kommt es zur Einwirkung von Scherkräften auf die luminale endotheliale Oberfläche, die durch Anomalitäten des Gefäßlumens verändert werden können.

Positive Scherkräfte besitzen grundsätzlich protektiven Charakter und scheinen endotheliale Zellkontakte zu verstärken (Urbich et al., 2000). An Orten mit positiven Scherkräften gelang zusätzlich der in-vitro Nachweis einer vermehrten Expression der anti-atherogen wirksamen endothelialen NO-Synthase, deren Wirkweise vasodilatatorische und antiaggregatorische Eigenschaften vermittelt (Noris et al., 1995).

Gewisse Areale des arteriellen Gefäßsystems prädisponieren auf der anderen Seite für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Sie entstehen bevorzugt an solchen Orten, an denen mit niedrigem oder turbulenten Blutfluss zu rechnen ist (Nerem, 1992; Caro et al., 1971). Solche Areale sensibilisieren die dort ansässigen Endothelzellen für Apoptose (Davies et al., 1986), wogegen Endothelzellen in vitro durch physiologisch-herrschende Scherkräfte durch das vorbeiströmende Blut geschützt werden (Dimmeler et al., 1996; Kaiser et al., 1997).

Tricot und Mitarbeiter konnten anhand Untersuchungen an Endarterektomiepräparaten von 42 humanen atherosklerotischen Plaques eine vermehrte Rate an Endothelzellapoptosen im poststenotischen Bereich der von ihnen untersuchten Karotisplaques nachweisen (Tricot et al., 2000). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Flusseigenschaften des Blutes durch bestehende Stenosen im Hinblick auf eine in Folge gesteigerte Apoptoserate des Endothels bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen eine Rolle spielen.

Darüber hinaus sind beschleunigte Zellalterungsprozesse in Regionen mit gestörten Blutströmungseigenschaften bereits beschrieben worden (Burrig, 1991) und könnten ebenfalls durch gesteigerten Zellumsatz Apoptoseraten im weiteren Verlauf in eine Oberflächenerosion einmünden.

2.6.5 Oxidativer Stress

Mit dem Begriff „Reactive Oxygen Species“ (ROS) werden in der Literatur eine Gruppe radikalischer und nichtradikalischer hochreaktiver Sauerstoffmetaboliten zusammengefasst. Ein Zustand mit erhöhtem oxidativen Stress entsteht, wenn Zellen hohen Konzentrationen dieser Sauerstoffradikale ausgesetzt werden. Mögliche Quellen des Radikals Superoxid (O_2^-) stellen neben Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten in besonderem Maße auch neutrophile Granulozyten dar, also Zellreihen, die ein fortgeschrittener Plaque mit dem dort vorherrschenden inflammatorischen Milieu in hohem Maße beinhaltet. Ein weiterer Ursprungsort ist das im Inneren der Gefäßwand lokalisierte Enzym NADPH-Oxidase, welches in atherosklerotischen Gefäßabschnitten vermehrt exprimiert wird (Griendling et al., 2000).

Die ROS summieren eine insgesamt schädliche Wirkung auf die Gefäßintegrität in Form verschiedener Mechanismen: zum Ersten greifen ROS direkt Zellstrukturen in Form von Membranen und Zellkernen an, was in eine Störung der Gefäßwandstruktur mündet.

Zweitens interagieren ROS mit den aus Endothelzellen entspringenden endogenen Mediatoren, die normalerweise vasoprotektive Funktionen wahrnehmen. Das von Endothelien synthetisierte NO reagiert beispielsweise mit Superoxid-Anionen, was nachfolgend dessen Inaktivierung und den Verlust des Vasodilationsvermögens zur Folge hat (Wever et al., 1998; Ray, Shah, 2005).

Drittens oxidieren ROS die in der Atherosklerosefrühphase eingewanderten Lipide (Carpenter et al., 1995), was zur vermehrten Bildung von oxidierten LDL führt, die bekanntlich eine Schlüsselfunktion in der Atherogenese darstellen (Libby, 2002). Neben dessen proinflammatorischen Wirkweise ist das oxLDL selbst in der Lage,

endotheliale Apoptosevorgänge in Gang zu setzen und es wird mittlerweile als der Hauptauslöser des programmierten Zelltods im Plaque angesehen (Salvayre et al., 2002; Sata, Walsh, 1998; Farber et al., 1999; Chen et al., 2003). Neben den erwähnten Eigenschaften besitzt das Superoxid zudem vermutlich selbst proapoptotischen Effekt auf lokale Endothelzellen (Kojda, Harrison, 1999; Betteridge, 2000; Napoli et al., 2001).

Oxidiertes LDL wird nicht nur in Makrophagen in Form von Schaumzellen angesammelt: im nicht phagozytierten Zustand stimuliert es innerhalb des Plaque fortlaufend die Synthese von Zytokinen aus den umliegenden Zellstrukturen (Valgimigli et al., 2003b). Diese Zytokine rufen dann Änderungen der SMC-Struktur hervor und steigern via Chemotaxis die Migration von Monozyten in die Gefäßwand. Der initialen Endothelzellaktivierung folgt deren Freisetzung des Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), beides Faktoren, die Migration und Differenzierung der Monozyten gewährleisten.

Diese Erkenntnisse implizieren, dass in der Arterienwand lokalisierter, aus verschiedenen Quellen entspringender oxidativer Stress durch o. g. Mechanismen atherosklerotische Wandveränderungen nachteilig beeinflusst. Durch direkte Förderung inflammatorischer Marker besteht somit auch eine mögliche Verbindung zur Beeinflussung apoptotischer Aktivität.

2.6.6 Endothelzellregenerate

Betrachtet man den fortgeschrittenen Plaque als Ort mit einem dort herrschenden gesteigerten Endothelzellumsatz – wie dies bei vermehrter Apoptoserate definitiv der Fall scheint – so muss im Laufe der Progression einer atherosklerotischen Formation von einem nicht unerheblichem Teil an lokal nachwachsenden Endothelzellpopulationen ausgegangen werden (Lin, 1996). Fournet et al berichten über phänotypische sowie funktionelle Veränderungen der von ihnen untersuchten Schweineendothelzellregenerate, die in der Studie wiederum durch den Verlust antithrombotischer Eigenschaften gekennzeichnet waren. Dies war neben einer

vermehrten Akkumulation subendothelialen LDL's insbesondere durch eine verminderte Synthese des hochpotenten Vasodilatators NO auffallend (Fournet-Bourguignon et al., 2000). Unter apoptotischen Bedingungen vermehrt auftretende dysfunktionelle Endothelzellregenerate könnten demnach zu einer lokalen Steigerung der Thrombogenität auffallen, die durch den Verlust atheroprotektiver Eigenschaften gekennzeichnet wären.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Studie schloss insgesamt 38 konsekutive stationäre Patienten ein, die sich einer elektiven Operation einer hochgradigen ($\geq 70\%$) Karotisstenose zu unterziehen hatten. Die einbezogenen Patienten wurden in den gefäßchirurgischen Abteilungen der Universitätsklinik Frankfurt (Leitung Prof. T. Schmitz-Rixen) sowie der Städtischen Kliniken Frankfurt Höchst (Leitung Prof. W. J. Stelter) erfasst. Ein Teil der Patienten wurde von der Abteilung für Gefäß- und Thoraxchirurgie zur Abklärung einer ACI-Stenose in die neurologische Klinik (Leitung Prof. H. Steinmetz) überwiesen.

Es wurden 27 männliche und 11 weibliche Patienten untersucht, deren Altersverteilung sich aus Tabelle 3-6 ergibt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Frankfurt genehmigt. Sämtliche Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Möglichkeit der Unterbrechung oder völliger Verweigerung von Interview und Untersuchung war jederzeit gegeben.

3.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien der Studie umfassten die Vollständigkeit der Patientenunterlagen mit dokumentiertem neurologischem Aufnahmezustand, ein möglichst zeitnahe Abstand der Karotisendarterektomie zu dem vorangehenden Patienteninterview

sowie die erfolgreiche Asservierung des Karotis-Endarterektomiepräparats am OP-Tag.

Bezüglich Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen der Studienteilnehmer wurden keinerlei Beschränkungen vorgenommen.

3.1.2 Klinische Merkmale

Der Grad der Stenose wurde durch intraarterielle zerebrale Angiografie entsprechend den Kriterien des North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) bestimmt (1991b). Hierbei vergleicht man die gemessene Stenose mit dem Durchmesser der ACI oberhalb der Stenose im „gesunden“ Segment.

Orientierend an diesen NASCET-Kriterien wurden n=19 Patienten als „symptomatisch“ definiert, da diese zuvor im Sinne von retinalen bzw. hemisphärischen TIAs symptomatisch auffällig waren (Vgl. Tab. 1-1, „typische Symptome“). Entsprechend setzte sich die asymptomatische Patientengruppe aus den übrigen Individuen zusammen, die anamnestisch weiter zurückliegende oder keinerlei Beschwerden vereinten (n=19).

Die präoperative Medikation deckte sich in beiden Gruppen weitgehend und bestand im Wesentlichen aus Lipidsenkern, diversen Antihypertensiva sowie antithrombotischen Präparaten (Verteilung siehe Tab. 3-6). Sämtliche Aggregationshemmer und Antikoagulantien wurden routinemässig 6 Tage vor dem Operationstermin abgesetzt.

Die Erhebung aller anamnestischen Daten erfolgte unter Verblindung zu dem jeweilig angiografisch erhobenen Stenosegrad.

Die wesentlichen klinischen sowie demografischen Charakteristika der Studienpopulation sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

	Asymptomatisch	Symptomatisch
Patientenzahl	19	19
Männl. Geschlecht (%)	81	62
Alter (Median \pmSD, Jahre)	70 \pm 7	62 \pm 9
Stenosegrad (Median \pmSD, %)	88 \pm 5	79 \pm 9
Zeitraum seit ischämischen Ereignis		
<30 Tage (%)		82
30-60 Tage (%)		18
Risikofaktoren		
Arterieller Hypertonus (%)	70	61
Nikotin (%)	57	53
Diabetes melitus (%)	37	27
Hypercholesterinämie* (%)	35	36
Aktuelle Medikation		
Antihypertensiva (%)	54	58
Orales Antikoagulanz** (%)	4	10
Thrombozytenaggregationshemmer** (%)	65	70
Lipidsenker (%)	22	14

Tabelle 6: Klinische Merkmale der Studienpopulation

* definiert als LDL>160mg/dl (nüchtern)

** 6 Tage präoperativ routinemässig abgesetzt

3.1.3 Interview

Zur Erfassung eventuell existenter Risikofaktoren, einer aktuell bestehenden Medikation sowie vom Patienten selbst empfundene Symptome beantworteten alle Studienteilnehmer einen standardisierten und computergestützten Fragebogen. Dafür kam eine von Sitzler et al. eigens entwickelte Software zur Anwendung, die bereits in der Vergangenheit bei der Erfassung demografischer Patientendaten Verwendung fand (Sitzler et al., 1998).

3.2 Materialgewinnung

Die Entnahme des zu untersuchenden Plaquematerials erfolgte in der Klinik für Gefäßchirurgie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt (Direktor Prof. Dr. Schmitz-Rixen) sowie parallel in den Städtischen Kliniken Frankfurt Höchst (Prof. Dr. Stelter). Zusätzlich konnten einige Präparate (n=7) von Patienten der Gefäßchirurgischen Klinik der Heinrich-Heine Universitätsklinik Düsseldorf (Prof. Dr. Sandmann) gewonnen werden.

Sämtliche Karotispräparate wurden von einem Gefäßchirurgen durch routinemässige Endarterektomie en bloc operativ exzidiert. Als operatives Vorgehen wurde im überwiegenden Fall (n=33) die Eversionsendarterektomie (EEA) gewählt, die ein schonendes Verfahren der Plaqueexzision darstellt (Vgl. Abb. 13) und eine einfache Handhabung bei späterer histologischer Aufbereitung ermöglicht, da es sich um „en bloc“ Präparate handelt und das Restlumen weitgehend intakt bleibt.

Die Patienten wurden 5 Minuten vor dem Abklemmen der Karotis intraoperativ mit Heparin antikoaguliert (100 I.E./kgKG). Die Antagonisierung erfolgte mit Protamin (50U/kgKG) etwa 10 Minuten nach Lösung der arteriellen Klemmen. Nach Entnahme wurde die Plaque intraoperativ umgehend in isotoner Kochsalzlösung gespült um oberflächliche Blutbestandteile zu entfernen. Anschliessend folgte die Fixierung in 4%-iger Para-Formaldehydlösung für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur.

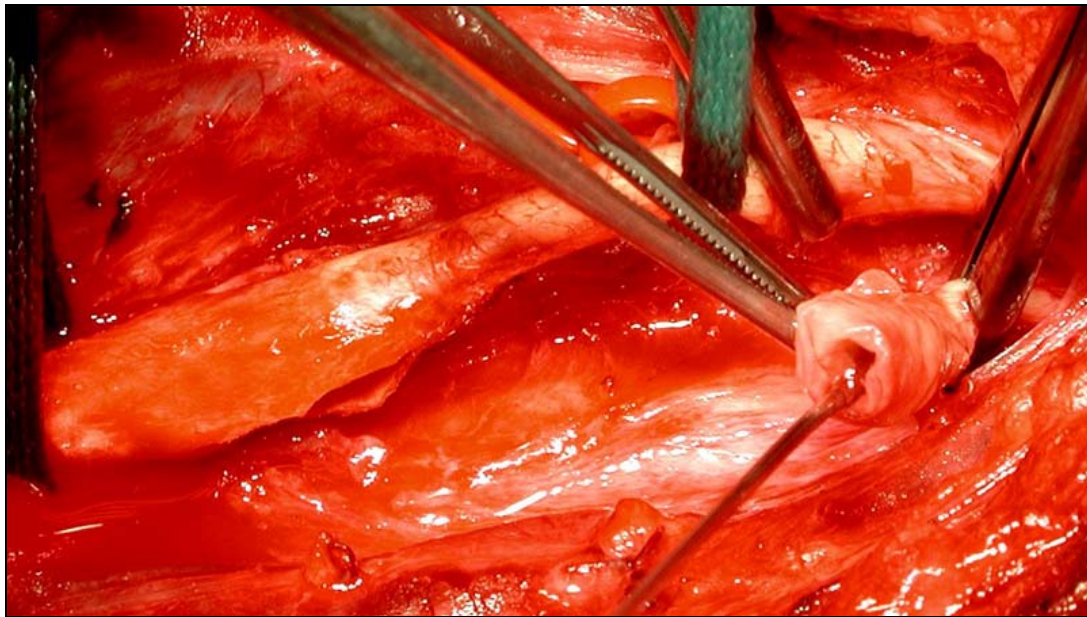


Abbildung 9: Eversion und Dilatation der A. carotis interna

(mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. W. J. Stelter und Dr. T. Umscheid,
Städtische Kliniken Frankfurt-Höchst, 2004)

3.3 Histologische Aufbereitung

3.3.1 Schnittanfertigung von Endarterektomiepräparaten

Die Entwässerung und Einbettung erfolgte maschinell im Routinelabor des Edinger-Instituts der Universitätsklinik Frankfurt-Main.

Nach Entfernung aus der Formalinlösung und Dekalzifizierung wurden die einzelnen Präparate vom proximalen Ende aus zunächst grob in 2mm dicke Gewebsblöcke unterteilt. Jede dieser Scheiben konnte nach Paraffinfixierung weiter in dünnere, ca. 3µm messende, Sektionen geschnitten werden. Im Anschluss wurden die Plaqueschnitte auf einen Objektträger (Fa. Roth, Karlsruhe) übertragen und sequentiell nummeriert. Zur quantitativ-histologischen Analyse wurden sämtliche Blöcke eines jeweiligen Plaque herangezogen.

Der Mittelwert (\pm SD) an Blöcken pro untersuchter Plaque eines Patienten betrug 7.2 ± 3.6 . Die Gesamtzahl aller untersuchten Schnitte belief sich auf insgesamt 279.

3.3.2 Übersichtsfärbungen Endothel

Von allen Plaque-Sektionen wurden die Übersichtsfärbungen Elastica van Gieson (EvG) und Hämatoxilin-Eosin (HE) zur mikroskopischen Routineuntersuchung angefertigt. Die Charakterisierung vitaler Endothelzellen gelang in Kombination dazu mittels immunhistochemischer CD31-Markierung. Apoptotische Endothelzellen konnten durch Anwendung der TUNEL-Färbetechnik identifiziert werden. Die histologischen Färbetechniken wurden anhand eines standardisierten Protokolls durchgeführt.

3.3.2.1 Hämatoxilin-Eosin (HE-) Färbung

Die HE-Färbung bezeichnet man als eine der Grundfärbungen der Histologie, da sie sämtliche Zellkerne (die den blauen Färbestoff Hämatoxilin aufnehmenden) deutlich gegen das mit Eosin gegengefärbte Zytoplasma hervorheben. Somit lassen sich fast alle Gewebe gut anfärben und die Differenzierung einzelner Zellreihen wird vereinfacht.

Für die HE-Färbetechnik wurden folgende Materialien verwendet:

- Saures Hämatoxylin nach Ehrlich
- Eosin (C.I.45380)
- Xylol
- Isopropanol (100%, 98%, 96%, 90%, 80%, 70%)
- Aqua dest
- Leitungswasser

Zunächst erfolgte eine 3x10-minütige Einwirkphase mit Xylol. Im Anschluss daran werden die Deckgläser jeweils 5 Minuten lang in Isopropanol getaucht (absteigend 98%, 96%, 90%, 80%, 70%). Nach Entnahme werden die Präparate 5 Minuten mit Aqua dest gereinigt. Nun folgt die 5-minütige Färbung der Zellkerne in saurem Hämatoxylin nach Ehrlich. Nach kurzem Abspülen mit Leitungswasser folgt die 15-minütige Bläuung in fließendem Aqua dest. Nun werden die Deckgläser einer Einwirkphase mit Eosinlösung (1g Eosin in 100ml Aqua dest. lösen) unterzogen (3

Minuten). Nach kurzem Abspülen mit Aqua dest folgt die Alkoholfixierung (jeweils 5 Sekunden mit 70%-/80%-/90%-igem Isopropanol, dann 2x5 Minuten reinem Isopropanol). Abschliessend wirken die Deckgläser erneut im Xylolbad ein (3 Minuten).

Die Zellkerne erscheinen nun blauschwarz bis violett, die zytoplasmatischen Bestandteile sind rosa bis rot gefärbt.

3.3.2.2 van Gieson-Färbung

Eine zusätzliche Färbung mit Elastica van Gieson dient der Färbung von Strukturen (insbes. Elastische Fasern), die durch die o.g. HE-Färbung nicht erfasst werden.

Für die van Gieson-Färbemethode sind folgende Chemikalien erforderlich:

- Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung-A und Lösung-B
- Pikrinsäure (C.I.10305)
- Säurefuchsin (C.I.42685)
- Salzsäure 25%ig
- Isopropanol 70%ig

Nach Auftragen von Weigerts Eisenhämatoxylin (1 Teil Lösung-A zu 1 Teil Lösung-B) auf die Deckgläser wird 5 Minuten in Aqua dest. gespült. Nach kurzem (ca. 3 Sekunden) Einwirken von Salzsäurealkohol (100ml 70%iger Isopropylalkohol + 2ml 25%ige Salzsäure) folgt die erneute A. dest Spülung, sowie eine kontinuierliche (15-minütige) Leitungswasserbehandlung. Anschliessend werden die Schnitte für 30-60 Sekunden in das van Gieson-Gemisch eingelegt (100ml gesättigte wäßrige Pikrinsäurelösung (= 1,2%ig) werden mit 10ml 1%iger Säurefuchsinlösg. versetzt (=dunkelgranatrote Färbung)). Nach letzmaligem Spülen mit Aqua dest kann die aufsteigende Alkoholreihe (70% - 96% - 100% je 2 mal 2 min) zur Anwendung kommen. Nach Xylolbehandlung erfolgt der Harzeinschluß.

Als Ergebnis stellen sich Zellkerne braun-schwarz, Bindegewebe rot, Muskulatur und Cytoplasma gelb dar.

3.3.3 CD31-Endothelzellmarkierung

Der Begriff Cluster of Differentiation, abgekürzt CD, bezeichnet Oberflächenmerkmale von Zellen verschiedener Gewebe, die sich aufgrund immunphänotypischer Kriterien unterscheiden lassen. Das PECAM („platelet endothelial cell adhesion molecule“) – auch unter dem Kürzel CD31 bekannt – ist ein auf Endothelzellen sowie neutrophilen Granulozyten exprimiertes Molekül und gilt aufgrund der einfachen Markierbarkeit mittels Antikörpern als der sensitivste und spezifischste endotheliale Marker überhaupt. Es ist normalerweise an Zellsignalisierung und Zelladhäsion beteiligt.

Um dieses Molekül immunhistochemisch zu markieren, werden folgende Materialien benötigt:

- Diaminobenzidin, DAB (Fa. DAKO, Hamburg)
- Peroxidase Blocking Reagent (Fa. DAKO, Hamburg)
- Ziegen-Serum (Fa. DAKO, Hamburg)
- Erstantikörper: CD 31-Antikörper (Fa. DAKO, Hamburg)
- Zweitantikörper: biotinyliertes anti-rabbit-igG, (Fa. Amersham Life Science, Freiburg)
- PBS (Phosphate-buffered saline)
- Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC kit, Fa. Vector-Laboratories, Burlingame/USA)

Die Plaqueschnitte wurden zunächst einmalig in PBS (Phosphate-Buffered-Saline) gewaschen und anschliessend mit Peroxidase Blocking Reagent für 10 Minuten inkubiert. Auf zweimaliges Waschen mit PBS folgte zur Blockierung einer unspezifischen Bindung die zehnminütige Inkubation in 10%iger Ziegen-Serum-Lösung (RT).

Im Anschluss wurden die Präparate mit Erst-Antikörper-Lösung (CD31, Konzentrationsverhältnis 1:200) für 30 Minuten inkubiert. Diese wurde durch

Mischung von 900 µl 1% BSA-Lösung in PBS mit 100 µl CD 31-Antikörper hergestellt, daraus ergab sich eine Gesamtmenge von 1000µl an CD31-Erst-Antikörper-Lösung (pro Schnitt werden ca. 100 µl benötigt). Es schloss sich die dreimalige Spülung mit PBS an. Als nächstes wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem Zweit- oder auch „Brückenantikörper“ (biotinyliertes anti-rabbit-igG, Fa. Amersham Life Science, Freiburg) versetzt (RT), der nun den Erstantikörper bindet. Es wird wiederum 3 malig mit PBS gewaschen. Im Anschluss fügte man den Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC kit, Fa. Vector-Laboratories, Burlingame/USA) hinzu. Die Anfärbung der CD31-markierten Zellen erfolgte nun indirekt durch Spülung mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB).

Endothelzellen heben sich dann durch eine wesentlich rötlich-dunkle Erscheinung gegenüber den umliegenden Strukturen hervor (Vgl. Abb. 10).

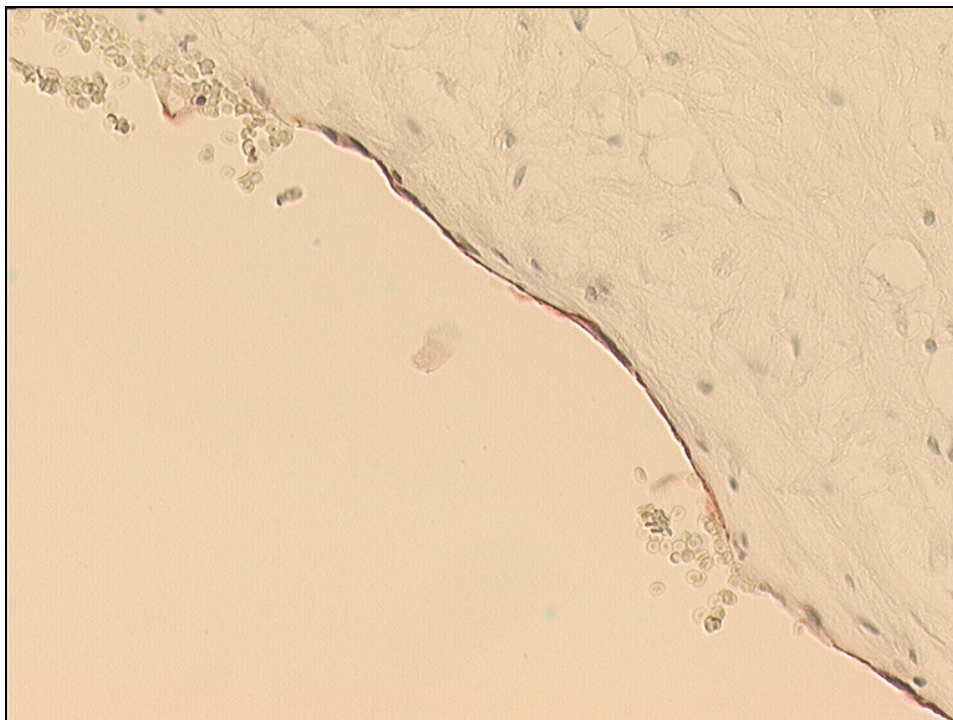


Abbildung 10: CD31-Antikörper markierte Endothelzellschicht

Anti-CD31-Färbung der Endothelzellschicht in einer symptomatischen Karotisstenose
(40-fache Vergrößerung, eigene Quelle)

3.3.4 TUNEL-Apoptosenfärbung

Immunhistochemische Färbungen erlauben den Nachweis eines wichtigen biochemischen Merkmal der Apoptose, dem geordneten Abbau der zellulären Kern-DNA und deren Freilegung in Fragmente. Das bei der TUNEL-Färbung (=„terminal dUTP nick end labeling“) zur Anwendung kommende Enzym TdT (=terminale Desoxynukleotid-Transferase) bindet Digoxigenin-Nukleotide an die 3'-OH Enden der DANN Fragmente (=„nicks“). Die auf diese Weise eingebauten Nukleotide werden anschliessend durch einen anti-DIG-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase in einer Färbereaktion sichtbar gemacht. Auf diese Weise können Zellkerne mit DNS-Brüchen, die beim programmierten Zelltod typischerweise entstehen, mikroskopisch dargestellt werden (Gavrieli et al., 1992).

Die Apoptosefärbungen der den Endothelzellfärbungen angrenzenden Gewebsschnitte wurde mit Hilfe eines Färbekits (ApopTag in situ Apoptosis Detection Kit, Fa. Intergen, USA) durchgeführt. Die Färbungen erfolgten anhand des vom Hersteller beigelegten Färbeprotokolls.

Folgende Materialien wurden verwendet:

- Aqua
- Xylol
- Natriumcitrat, Zitronensäure, 3%
- Apoptosis detection Kit (enthält biotynilierte-dUTP)
- Proteinkinase K (20µg/ml, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- TdT-Enzym Markierungsgemisch (ApopTag in situ Apoptosis Detection Kit, Fa. Intergen, USA)
- anti-Digoxigenin-Peroxidase Antikörper (Fab-Fragmente, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- Diaminobenzidin-Lösung (DAKO-Liquid DAB, Fa. Dako, Hamburg)

Nach Entparaffinisierung der Präparate gelingt die Elimination von Kalzium durch 3% Zitronensäure. Dies ist vonnöten, da es sonst zu einer unspezifischen Markierung von calciumhaltigen Matrixvesikeln kommen kann (Kockx et al., 1996b). Nach 15-

minütiger Vorbehandlung mit Proteinkinase K (20µg/ml, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) erfolgt zunächst die einstündige Inkubation der Gewebsschnitte mit einem TdT-Enzym Markierungsgemisch (37°C). Nach 30-minütiger Einwirkung von anti-Digoxigenin-Peroxidase Antikörper (Fab-Fragmente, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) und Bad in 3,3 Diaminobenzidin-Lösung für 5 Minuten (DAKO-Liquid DAB, Fa. Dako, Hamburg) können die Digoxigenin-Nukleotide sichtbar gemacht werden. Positive Zellen färben sich braun und weisen apoptotische Endothelzellen nach.

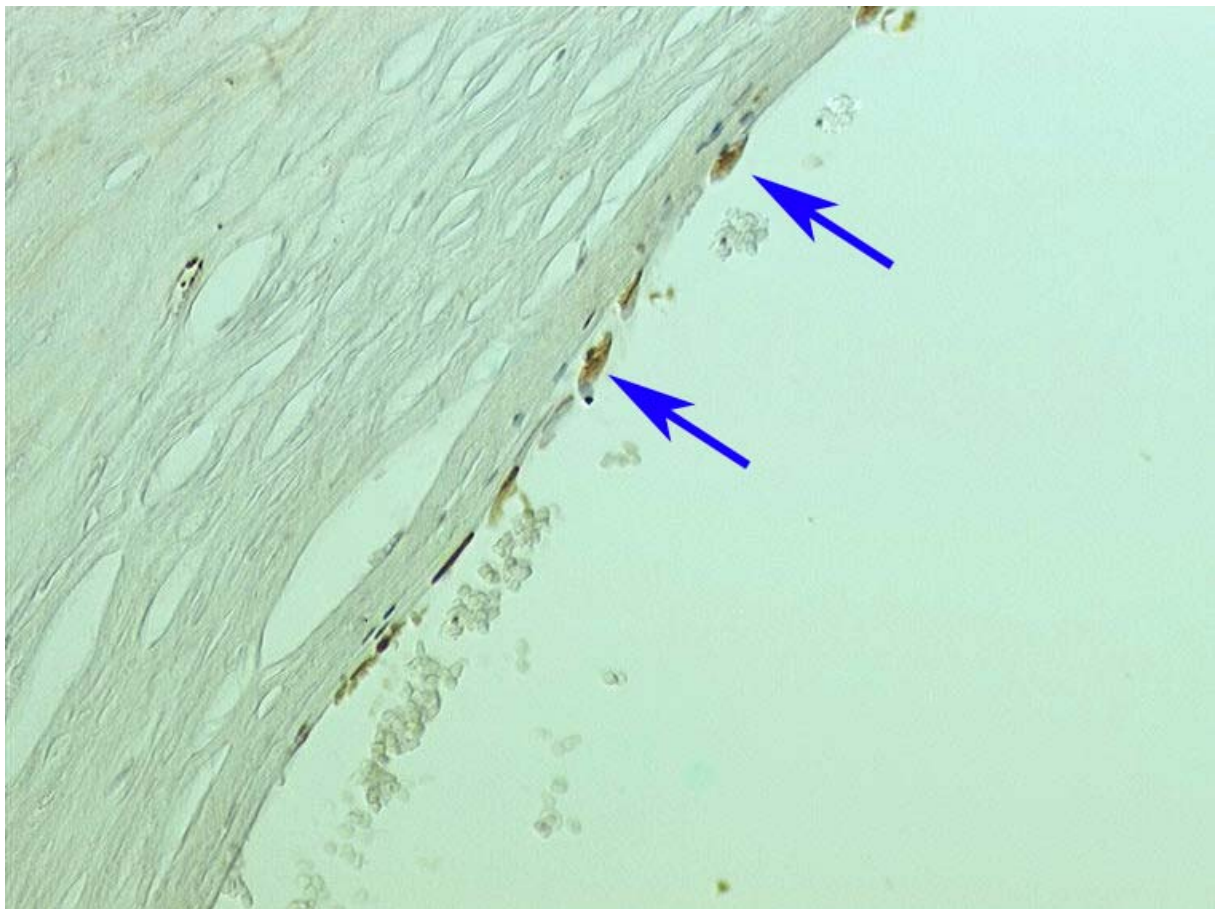


Abbildung 11: TUNEL-Technik zur Apoptosenfärbung

Die Pfeile markieren die positiv gefärbten (=braun) apoptotischen Endothelzellen. Stets erkennbar sind luminal gelegene Erythrozytenaggregate (40-fache Vergrößerung, eigene Quelle).

3.4 Bildbearbeitung und Morphometrie

In der vorliegenden Studie wurde die quantitative Auswertung der Präparate an einem Lichtmikroskop (Fa. Olympus, Modell BX-50) durchgeführt, wobei nach groben Aufsuchen der Präparate bei 5-facher Vergrößerung die detaillierte Auszählung bei 40-facher Vergrößerung erfolgte. Die auf Deckgläsern gefärbten Plaqueschnitte wurden durch einen auf den Mikroskoptubus montierten Kameraaufsatz (Fa. Hitachi, Modell HV-C20) auf einen handelsüblichen Personal Computer mittels der Bildimportsoftware analySIS (Fa. Soft Imaging System, Münster) digitalisiert. Die digitale Bildverarbeitung erlaubt eine standardisierte Bildanalyse. Weiterhin ermöglicht die digitale Justierung einzelner RGB-Kanäle eine exaktere Abgrenzung von Endothelien zu benachbarten Strukturen.

Jede spezifisch immunreaktiv (CD31) positive Zelle (Abb. 10) wurde mikroskopisch unter Berücksichtigung des ursprünglich vorhandenen ACI-Lumens als vitale Endothelzelle gewertet. Es wurden lediglich die dem Gefäßlumen zugewandten Endothelien berücksichtigt, da innerhalb der Adventitia gelegene kapilläre Strukturen ebenfalls positiv reagierende Endothelien aufweisen können. Die zusätzlich angewendete HE-Übersichtfärbung diente zur Unterstützung beim Aufsuchen der lumenseitigen Endothelien.

Eine apoptotische Endothelzelle wurde als solche gewertet, wenn diese eine positive Färbung mit CD31 sowie eine positive TUNEL-Reaktion in der angrenzenden Schnittebene vereinte. Die Gesamtzahl apoptotischer Endothelzellen in jeder Plaquesektion wurde am Bildschirm gezählt und tabellarisch dokumentiert.

Das Vorliegen einer Plaqueruptur wurde als intimaler Defekt definiert, der eine Breite grösser als 1000µm aufweisen konnte und bei dem es in Verbindung damit zu einer histologisch erkennbaren Freilegung des nekrotischen Kerns (vgl. Abb. 6) gekommen war (Sitzer et al., 1995). Für jeden Plaque wurde die jeweilige An- oder Abwesenheit einer Ruptur dokumentiert.

Die Charakterisierung eines unrupturierten Plaques gelang einerseits durch makroskopische Betrachtung desselben vor histologischer Aufarbeitung; zum anderen durch o.g. histologische Verifizierung.

Die Auszählung sämtlicher Zellen sowie die histologische Einteilung hinsichtlich stattgefundener Ruptur erfolgte unter vollständiger Verblindung, d. h. die gesamten Daten der Studienpopulation (u. a. Patientennamen, Symptomatik, Risikofaktoren) waren den Untersuchern während der histologischen Begutachtung nicht zugänglich. Die morphometrischen Daten wurden unabhängig von zwei Untersuchern dokumentiert, die angegebenen Werte ergeben sich bei groben Abweichungen aus Mittelwerten der beiden Betrachter.

3.5 Statistik

Die komplette statistische Auswertung erfolgte am PC mittels der statistischen Analysesoftware SPSS, Version 12.0 (Fa. SPSS GmbH Software, München). Sämtliche quantitativen Analysen erfolgten unter Verblindung aller erhobenen klinischen Patientendaten.

Die Beziehung zwischen vorliegenden Endothelzellapoptosen, klinischer Symptomatik und histopathologischen Charakteristika im Sinne einer vorliegenden Ruptur wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test für Vergleich der Mediane zweier unabhängiger Zufallsgrößen untersucht. Als Nullhypothese wurde jeweils angenommen, dass sich die Gruppen (symptomatisch vs asymptomatisch sowie rupturierte vs unrupturierte) nicht unterscheiden. Da konsequente Tests zur Anwendung kamen erfolgte das α -adjustment entsprechend der modifizierten Bonferroni-Prozedur. Bei jeder einzelnen Berechnung ist die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1.Ordnung 5%. Bei mehreren Berechnungen steigt die Wahrscheinlichkeit, bei mindestens einer Berechnung einen solchen Fehler gemacht zu haben – die Bonferroni-Korrektur bedeutet, dass das Signifikanzniveau durch die Anzahl der durchgeführten Tests geteilt wird. In unserem Fall heißt das,

dass nur noch Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05/3$, also von $p < 0,017$, als signifikant gewertet wurden.

Unter Zuhilfenahme der Pearson-Korrelation erfolgte der Interparametervergleich.

4 Ergebnis

4.1 Aufstellung asymptomatisch vs. symptomatisch

	Asymptomatische* (n=19)			Symptomatische* (n=19)		
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum
Gesamtzahl apoptot. EC	0	0	4	2	0	19
Gesamtzahl vitale EC	295	218	1137	506	133	1272
mittlere% apoptotischer EC pro Plaque	0,0	0,0	3,0	0,7	0,0	6,0

Tabelle 7: Aufstellung symptomatisch vs. asymptomatisch

* „symptomatische Patienten“ = Vorhandensein ipsilateraler zerebraler Ischämie <60 Tage

4.2 Gegenüberstellung unrupturierte vs. rupturierte Plaqueoberfläche

	unrupturiert (n=21)			rupturiert* (n=17)		
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum
Gesamtzahl apoptot. EC	0	0	18	0	0	19
Gesamtzahl vitale EC	456	133	1137	323	218	1272
mittlere% apoptotischer EC pro Plaque	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	5,7

Tabelle 8: Gegenüberstellung unrupturierte vs. Rupturierte Plaques

* Plaqueruptur=intimaler Defekt >1000µm plus histologisch erkennbare Freilegung des nekrot. Kerns

4.3 Nichtparametrische Tests: symptomatisch vs. asymptomatisch

Statistik für Test^b

	Gesamtzahl apoptotischer EC	Gesamtzahl vitaler EC	mittlere% apoptot. EC pro Plaque
Mann-Whitney-U	99,500	135,000	99,000
Wilcoxon-W	289,500	325,000	289,000
Z	-2,565	-1,329	-2,574
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,010	0,184	0,010
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,017 ^a	0,191 ^a	0,017 ^a

Tabelle 9: Nichtparametrische Tests: symptomatisch vs. asymptomatisch

a: nicht für Bindungen korrigiert

b: Gruppenvariable = „ipsilaterale zerebrale Ischämie innerhalb der letzten 60 Tage“

4.4 Nichtparametrische Tests: rupturierte vs. unrupturierte Plaqueoberfläche

Statistik für Test^b

	Gesamtzahl apoptotischer EC	Gesamtzahl vitaler EC	mittlere% apoptot. EC pro Plaque
Mann-Whitney-U	132,000	141,500	133,000
Wilcoxon-W	363,000	261,500	364,000
Z	-,888	-,513	-,851
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,374	0,608	0,395
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,427 ^a	0,612 ^a	0,446 ^a

Tabelle 10: Nichtparametrische Tests: rupturierte vs. Unrupturierte Plaques

a: nicht für Bindungen korrigiert

b: Gruppenvariable = „Ulzeration“

4.5 Ergebnisse zusammengefasst

In der in unserer Studie untersuchten Plaquesektionen konnte der Nachweis apoptotischer Endothelzellen erbracht werden. Insgesamt betrachtet war das Auftreten apoptotischer vaskulärer Endothelzellen jedoch selten, ergab aber ein jeweils signifikantes Überwiegen hinsichtlich Gesamtzahl apoptotischer Endothelzellen ($p=0.016$) sowie der relativen (mittlere %) Zahl apoptotischer Zellen ($p=0.015$).

Hinsichtlich dem Auftreten von Endothelzellapoptosen liess sich kein wesentlicher Unterschied zwischen einer rupturierten und einer unrupturierten Plaqueoberfläche ausmachen. Die mittlere Prozentzahl betrug hierbei beim gleichzeitigen Vorliegen einer Ruptur 0.00 (0.00-5.97) verglichen mit 0.00 (0.00-5.72) bei einer rupturfreien Oberfläche.

Ein marginaler Trend konnte bei der Betrachtung der Endothelzellapoptoserate in der unrupturierten Plaquegruppe in der Gegenüberstellung zu einer vorhandenen Symptomatik festgestellt werden. Bei symptomatischen Patienten betrug die mittlere Prozentzahl apoptotischer Endothelien 0.27 (0.00-5.97) gegenüber dem asymptomatischen Patientenkollektiv mit 0.00 (0.00-2.98). Diese Beobachtung war allerdings nicht signifikant.

5 Diskussion

5.1 Diskussionsansätze

Folgenden Ansätzen soll im nachfolgenden Teil der Diskussion nachgegangen werden:

- Existiert eine positive Korrelation zwischen der Endothelzellapoptoserate und dem gleichzeitigen Vorliegen einer symptomatischen Karotisstenose?
- Ist eine unrupturierte Plaqueoberfläche an das begleitende Auftreten von höheren Endothelzellapoptoseraten gekoppelt?
- Kann ein Plaque mit unrupturierter Oberfläche mehr symptomatische als asymptomatische Patienten vereinen?

5.1.1 Korrelation zwischen EC-Apoptosen und Symptomatik?

Die stetig wachsende Beweislage tierischer und menschlicher Studien an atherosklerotischen Gefäßläsionen suggeriert, dass der Prozess der Apoptose ein Hauptereignis in der Pathophysiologie der frühen Atherosklerose darstellt. Der Nachweis von Apoptose bei Endothelzellen gelang bislang sowohl in-vitro als auch in-vivo (Rossig et al., 2001). Auch konnte der programmierte Zelltod des Endothels bereits in Verbindung mit einer thrombosierten Plaqueerosion beobachtet werden (Bombeli et al., 1997), die neben der Ruptur einen alternativen Weg der Destabilisierung der fortgeschrittenen Atherosklerose darstellt.

Trotz gegenwärtig existierender Nachweise einer lokal (Durand et al., 2004) und systemisch (Kavurma et al., 2005) gesteigerten Thrombogenität unter ablaufenden Apoptosevorgängen existieren für humane Karotisplaques keine Studien, die einen direkten Bezug zwischen einer absoluten Zahl lokal nachweisbarer apoptotischer Endothelien und auf die Karotisstenose zurückzuführende Symptomatik als Auswirkungen einer Destabilisierung herstellen. Lediglich für Koronarplaques fanden sich bislang Hinweise auf eine gesteigerte Endothelzellapoptoserate bei

symptomatischen ACS-Patienten im Gegensatz zu Patienten mit Symptomen im Zeichen der stabilen Angina pectoris (Rossi et al., 2004). Dieser Nachweis gelang jedoch lediglich anhand der serologischen Expression apoptotischer Gene und nicht - wie auch in unserer Studie durchgeführt - durch die direkte histologische Quantifizierung einzelner im Plaque lokalisierter Zellen.

Trotz der anerkannten Hypothese, dass eine initiale endotheliale Dysfunktion – wohl in Form von Apoptose – den Beginn der Progression einer atherosklerotischen Läsion bedeutet, wurde bislang lediglich vermutet, dass der apoptotischer Zelltod verschiedener Zellreihen – nicht also nur der Endothelien - zu Plaqueinstabilität, Ruptur und Thrombusformation beiträgt. Die Hauptrolle der Zellapoptosen wurde bislang vor allem in Zusammenhang mit dem zunehmenden Wachstum des nekrotischen Kerns (Kavurma et al., 2005), einer Ausdünnung der fibrotischen Deckplatte mit konsekutiver Steigerung der Rupturgefahr (Viles-Gonzalez et al., 2004) sowie einer Thrombogenitätssteigerung durch die gesteigerte TF-Expression (Bombeli et al., 1997; Mallat, Tedgui, 2001) gesehen.

Die von uns erfassten Ergebnisse bezüglich der Apoptosenrate in Bezug auf eine klinische Symptomatik liefert geringe absolute, jedoch unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage, angedeutete Hinweise für die endotheliale Apoptose als möglichen alternativen Schritt des Mechanismus der Destabilisierung einer Plaque neben der Ruptur. Die mittlere Prozentzahl an histologisch quantifizierten Apoptosen unterschied sich in den asymptomatischen und symptomatischen Patientengruppen kaum. Lediglich die mittlere Prozentzahl von 0.69 im symptomatischen Kollektiv ist gegenüber dem der asymptomatischen (0.00) signifikant erhöht ($p=0.017$). Im Gegensatz zu Studien, in denen der Nachweis apoptotischer Endothelzellen innerhalb einer fortgeschrittenen Karotisplaque in signifikanter Zahl gelang (Tricot et al., 2000), ist die von uns in dieser Studie nachgewiesene Apoptosenrate signifikant geringer. Trotzdem stehen unsere erhobenen quantitativen Befunde über das Vorliegen von Endothelzellapoptosen im Einklang mit dem in der Literatur generell nachgewiesenen programmierten Zelltods innerhalb atherosklerotischer Plaques (Viles-Gonzalez et al., 2004).

Warum sollen vermehrte Endothelzellapoptosen zu einer vermehrt auftretenden Symptomatik führen? Die Ausbildung eines Thrombus ist bereits ohne die Anwesenheit einer Ruptur beschrieben worden und unter dem Begriff Erosion zusammengefasst worden (Farb et al., 1996b; Virmani et al., 2000). Eine Destabilisierung der Plaque muss also durch andere Mechanismen vonstatten gehen können als durch Kontakt des thrombogenen Materials aus dem Plaqueinneren mit dem Blutstrom, wie dies bei einer Ruptur der Fall ist.

Ross konstatierte bereits, dass initiale Veränderungen des Endothels und die nachfolgend zunehmende Entzündungsreaktion im Plaqueinneren die wesentlichen Merkmale einer atherosklerotischen Läsion darstellen. Die Konsequenzen dieser Veränderungen des Endothels sind des öfteren unter dem Synonym „response to injury“ zusammengefasst worden, liefern aber keine detaillierten Erklärungen über die Abläufe, die sich an der luminalst gelegenen Zellschicht – der Endothelien – abspielen. Arbeiten der letzten Jahre gehen zunehmend von der Apoptose als Schlüsselereignis der Endothelläsion in der frühen Atherogenese aus. Die Arbeiten von Bombeli konnten erstmals den direkten Zusammenhang einer Thrombusformation als Antwort auf apoptotische Endothelzellen herstellen (Bombeli et al., 1997). Der durch Stautosporin artifiziell ausgelöste Apoptosevorgang führte in der Mehrzahl der Fälle zu einer signifikant gesteigerten Thrombusausbildung als Folge einer gesteigerten PS-Exprimierung durch gesteigerte Expression von TF. Zusätzlich konnte eine Reduktion von TM, TFPI sowie HS beobachtet werden, allesamt Stoffe, die auf Endothelebene antithrombotische Eigenschaften vermitteln.

Durand und Mitarbeiter konnten ebenfalls eine Thrombusformation auf Gefäßoberflächen als Antwort auf eine dort artifiziell-induzierte Endothelzellapoptose ausfindig machen. Diese Ergebnisse wurden durch histologische Betrachtung verifiziert (Durand et al., 2004), wobei die Arbeitsgruppe - wie in unserer Versuchsdurchführung - die CD31-Technik in Kombination mit der TUNEL-Färbemethode angewendet haben.

5.1.2. Korrelation EC-Apoptosen mit rupturierter Oberfläche?

Weiterhin haben wir die Häufigkeit von Endothelzellapoptosen mit dem gleichzeitigen Vorliegen einer unrupturierten Plaqueoberfläche verglichen. Die Grundlage hierfür

bildet das bereits beschriebene Vorliegen oberflächlicher Erosion als alternativer Mechanismus einer Plaquestabilisierung. Demnach erscheint es wichtig, nach einer erhöhten Apoptosenrate auf unrupturierten Plaqueoberflächen zu fahnden, die dort vermutlich häufiger oder zumindest in gleichem Maße anzutreffen wären als in dem Kollektiv rupturierter Präparate. Dies könnte einen wichtigen Hinweis einer dominanten Rolle der Endothelzellapoptosen bei alternativen Destabilisierungswegen erbringen.

Zwischen den von uns untersuchten Gruppen der nicht-rupturierten (n=21) und rupturierten (n=17) Plaqueoberflächen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich dem Auftreten apoptotischer Endothelien gefunden werden. Gründe hierfür können die weiter unten beschriebenen möglichen Fehlerquellen (Kapitel 5.3) darstellen, die sich beispielsweise aus der jeweiligen chirurgischen Entnahmetechnik ergeben.

Diskutiert werden sollte jedoch die Betrachtung der beobachteten, verminderten Apoptosenrate in Zusammenhang mit einem Kollektiv der rupturierten Plaques im Hinblick auf den Destabilisierungsmechanismus. Trotz Untersuchung einer relativ niedrigen Zahl rupturierter Plaques (n=17) wiesen diese eine geringe Anzahl absoluter apoptotischer Endothelien auf, die Zahl vitaler Endothelzellen belief sich im Median auf 323 Zellen. Die daraus resultierende niedrige Rate apoptotischer Endothelien könnte wiederum ein Indiz für die fehlende Beteiligung apoptotischer Endothelzellen bei der Oberflächenruptur des Plaque absprechen. Ob und vor allem welche anderen – möglicherweise zusätzlichen oder amplifizierenden - Mechanismen zu einer Plaquestabilisierung prädisponieren, kann durch die vorliegende Studie nicht beantwortet werden.

5.1.3 Intakte Plaqueoberfläche vs. Symptomatik?

Die bisherig publizierten Studien beinhalten oftmals uneinheitliche Ansichten über den Begriff der Instabilität, der bis heute nicht eindeutig definiert ist. Ein instabiler Plaque wird oftmals als reine luminale Oberflächenruptur mit nachfolgender Ausbildung eines Thrombus (Stoneman, Bennett, 2004) beschrieben. Fälle mit einer

histologisch dokumentierten Thrombusformation ohne begleitender Ruptur der luminalen Plaqueoberfläche (Sitzer, Trostdorf, 2003) bleiben in diesen Studien jedoch unberücksichtigt. Auch solche Fälle müssen jedoch auf Grundlage einer Beteiligung gestörter Endothelien bei der Destabilisierung einer Plaqueformation berücksichtigt werden, wie bereits in existierenden Studien beschrieben (Farb et al., 1996a; Virmani et al., 2000). Demnach erschien es uns plausibel, auch nach einer Korrelation zwischen klinischen Symptomen bei gleichzeitigem Vorliegen einer intakten, jedoch offensichtlich erodierten Plaqueoberfläche zu fahnden.

Trotz der insgesamt relativ niedrigen Anzahl untersuchter Karotisplaques und der marginalen statistischen Signifikanz konnte in der Gruppe der unrupturierten Plaques ein leichter Trend in der Gesamtrate apoptotischer Endothelzellen beobachtet werden. Die mittlere Prozentzahl apoptotischer Endothelzellen pro Plaque war bei dem symptomatischen Patientenkollektiv mit 5.97% gegenüber der asymptomatischen Gruppe (2.98%) erhöht. Diese Datenlage deutet zumindest an, dass neben der Ruptur weitere Mechanismen existieren müssen, die in eine Destabilisierung münden, was sich in Form einer klinischen Symptomatik bemerkbar macht. Diese Mechanismen sind unserer Ansicht nach der endothelialen Dysfunktion als Resultat auf dort ablaufende apoptotische Vorgänge zuzuschreiben.

Eine Ablösung der Endothelzellschicht mit begleitender Entblössung subintimaler Strukturen konnte parallel zu den erhobenen Resultaten in einigen wenigen immunhistochemisch CD31-markierten Präparaten beobachtet werden. Diese „Denudation“ ist jedoch der intra- und postoperativen Plaqueverarbeitung zuzuschreiben, da diese nicht mit einer intraluminalen Thrombusformation einherging. Das pathophysiologische Erscheinungsbild einer Denudation in Kombination mit einem Thrombus ist eines der Charakteristika während der Atherosklerose (Virmani et al., 2000).

5.2 Fehlermöglichkeiten (“Limitations“)

Bei der Interpretation der dargestellten Ergebnisse müssen gewisse Faktoren berücksichtigt werden, die Einfluss auf die erhobenen Resultate haben können.

Diese Beschränkungen betreffen neben bekannten methodischen Problemen mögliche Schwierigkeiten bei der Einteilung des Patientenkollektivs in Gruppen zunehmender Instabilität.

5.2.1 Erschwerte Detektion von Apoptose in vivo

Vermutlich sind der Detektion und folglich der Quantifizierung des apoptotischen Zelltods in vivo generell Grenzen gesetzt.

Die Observation apoptotischer Zellen ist möglicherweise dadurch erschwert, dass die vom programmierten Zelltod betroffenen Zellen rasch phagozytiert werden, was vermutlich in einem Zeitraum von 60 Minuten bereits vollständig abgeschlossen sein kann (Savill, Fadok, 2000; Fadok et al., 2001). Bemerkenswert ist eine Fähigkeit vitaler Endothelzellen, die in der Lage sind apoptotische Körperchen zu verschlingen, die in Folge dessen dem Beobachter verborgen bleiben könnten (Hess et al., 1997; Dini et al., 1995).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich apoptotische Endothelzellen aus dem Zellverband der Gefäßwand ablösen und dadurch in die Zirkulation ausschwemmen (Hladovec et al., 1978; Mallat et al., 2000; Mutin et al., 1999). Diese Delokalisation führt zu dem Hindernis, den in-situ-Nachweis für einen ablaufenden programmierten Zelltod „vor Ort“ in Endarterektomiepräparaten zu erbringen. Daraus folgt die Konsequenz, zukünftig neben einer lokalen histologischen Betrachtung auch den Fokus auf den Nachweis zirkulierender apoptotischer Zellen sowie Mikropartikel zu legen (Diamant et al., 2004b).

Im übrigen sei auf die kritische Betrachtung der gängigen TUNEL-Färbung hingewiesen. Diese Technik besitzt bekanntlich hohen Stellenwert als Standardnachweis für Detektion von Apoptose in Gewebsschnitten. Obwohl weit verbreitet, ist die Methode jedoch anfällig für mögliche Fehlerquellen: es konnte demonstriert werden, dass unter Anwendung der TUNEL-Technik auch Strukturen innerhalb eines atherosklerotischen Plaques markiert werden, die überhaupt nicht dem Zellkern entspringen und demnach kein Marker für eine Apoptose-spezifische

DNA-Fragmentierung darstellen (Kockx et al., 1996a). Einschränkend muss angemerkt werden, dass sich diese Fehler lediglich auf die intimale Oberfläche beschränken, da subintimale Strukturen bei der Quantifizierung unberücksichtigt blieben.

Ein weiteres Manko stellt die Möglichkeit der unspezifischen Markierung von Nuclei nach Vorbehandlung mit Proteinase K dar, die schon bei geringen Titrationsfehlern auftreten kann. Dies führt im Nachhinein zu einem merklichen Anstieg falsch-positiv markierter, letztlich jedoch nicht-apoptotischer Nuclei (Kockx, Knaapen, 2000). Vermutlich führt hier der Ablauf einer aktiven Gentranskription von Apoptose nicht-betroffenen Zellen zu einer fälschlichen Markierung durch die TUNEL-Technik (Kockx et al., 1998c), die dann unter dem Mikroskop betrachtet als Apoptosezellen gewertet werden. Man weiss jedoch nicht ob die hierbei transkribierten Gene überhaupt mit dem Apoptoseprozess zusammenhängen. Aus diesem Grund sollte die TUNEL-Methode stets mit zusätzlichen Techniken wie etwa dem direkten, jedoch aufwändigeren und kostenintensiveren Nachweis zellulärer Transkriptionsmarker kombiniert werden.

5.2.2 Variabilität in Zeitachsen

Studien an atherosklerotischen Plaques sind naturgemäß nur in der Lage, eine punktuelle Analyse des Plaquestadiums zu liefern, in dem sich die Läsion zum Zeitpunkt der chirurgischen Entnahme befindet. Hierbei wird die Betrachtung der zeitlichen Dynamik des pathogenetischen Prozesses der Atherosklerose völlig außer acht gelassen. Das vorliegende Plaquematerial entstammt von Patienten, die sich - in Anlehnung an Sary's AHA-Klassifikation der Plaquestadien (Diamant et al., 2004a) – in völlig unterschiedlichen Zeitachsen befinden. Im Allgemeinen zeichnen sich Plaques mit intimaler Verdickung sowie „fatty streaks“ durch geringe Apoptoseraten aus während fortgeschrittene Läsionen auffällige Areale mit einer Vielzahl apoptotischen Zellen aufweisen (Kockx, Knaapen, 2000). Daraus folgt, dass das Ausmass des nachweisbaren apoptotischen Zelltods stark vom jeweiligen Entwicklungsstadium der Läsion abhängt (Kockx et al., 1998b; Lutgens et al., 1999b). Weniger fortgeschrittene Läsionen würden nach dieser Theorie eine geringere Apoptoseaktivität aufweisen als Läsionen, die sich in einem späteren

Stadium befinden. Deswegen kann eine Variabilität der Apptoseraten in den einzelnen Fällen erwartet werden, wenn atherosklerotische Plaques aus verschiedenen Stadien der AHA-Klassifikation histologisch verglichen werden. Diese Variabilität lässt sich allerdings nicht vermeiden, da heutzutage keine Verfahren existieren, die eine Stadienerfassung in-vivo erlauben. Suggestiert man anhand des fortgeschrittenen Alters der Studienpopulation höhergradige Plaquestadien, so wird man vermutlich dazu verleitet, sämtliche untersuchte Plaques als Läsionen zu definieren, die sich in vergleichbaren Zeitachsen befinden. Die genaue Einteilung erfolgte in der Studie nicht und daher sind Unterschiede hinsichtlich Stadien möglich.

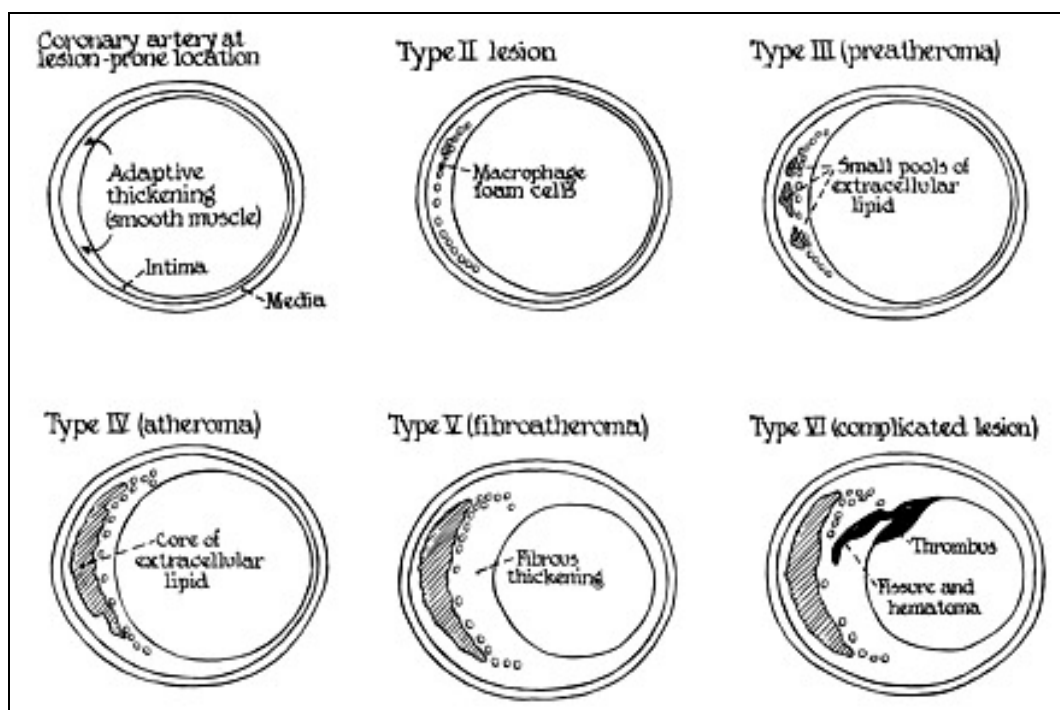


Abbildung 12: AHA-Stadien der Plaqueformation nach Stary

Unterschieden werden sechs Stadien zunehmender Lumeneinengung und Atherombildung (Quelle: Stary et al, A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. Circulation. 1995;92:1355-1374.)

5.2.3 Multiple Mechanismen gleichzeitig

Es wird vermutet, dass innerhalb atherosklerotischer Plaques eine fortlaufende Heterogenität pathologischer Mechanismen existiert, die zu Destabilisierung der Läsion und klinischer Symptomatik führt.

Farb et al haben 50 konsekutive Koronarplaques untersucht, die im Sinne eines „plötzlichen Herztods“ symptomatisch in Erscheinung getreten waren. 28 dieser Präparate konnte eine Oberflächendisruption im Sinne einer Ruptur zugewiesen werden. Auf der anderen Seite traten 22 Fälle als rupturfreie, oberflächlich erodierte Plaques auf. Die erodierten Plaques waren hierbei reich an SMC und zeigten eine geringere Kalzifizierung als Präparate mit nachgewiesener Ruptur (Farb et al., 1996b). Ähnliche, jedoch weniger ausgeglichene Raten erhob die Arbeitsgruppe um Falk: in dessen Studie zeichnete sich eine Plaqueruptur in rund 75% der untersuchten Fälle für die symptomatische Koronarthrombose verantwortlich. Trotzdem fanden sich auch hier in 20% der Präparate eine postmortem verifizierte oberflächliche Erosion ohne einen erkennbaren Defekt im Sinne einer Ruptur (Falk, 1991).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass eine rupturfreie Oberflächenerosion ebenso zu akuten thrombotischen Komplikationen prädisponiert wie Zustände histologischer Plaqueschnitte, die man mit einer Fissur der luminalen Oberfläche beschrieben hat. Aus diesem Grund muss von einer Heterogenität dieser zwei Mechanismen ausgegangen werden, die an verschiedenen Orten eines fortgeschrittenen Plaque vermutlich auch parallel ablaufen könnte. Welcher Mechanismus zuerst greift, d.h. welcher Mechanismus letztendlich in einen oberflächenständigen Thrombus mündet ist nicht vorauszusagen. Die Destabilisierung in Form einer Erosion schliesst also eine mögliche Ruptur nicht aus und umgekehrt. Endothelzellapoptosen könnten anhand dieser Theorie einerseits die Thrombosierung ohne Ruptur begünstigen, andererseits jedoch begleitend zur stattgefundenen Ruptur auftreten. Möglicherweise sind dann andere – unter Umständen unbekannte – Mechanismen verantwortlich, die in die Ausbildung des luminalen Thrombus münden.

5.2.4 OP-Verfahren und Materialaufbereitung

Ein weiterer limitierender Faktor bei der Ergebnisbetrachtung stellt die Methodik der operativen Karotisendarterektomie dar, die den Plaque für die histologischen

Untersuchungen liefert. Die Anwendung verschiedener Techniken kann die Qualität der Präparate bereits bei der chirurgischen Entnahme beeinträchtigen. Die longitudinale Arteriotomie ermöglicht dem Gefäßchirurgen zunächst eine intraoperativ häufig notwendige grobe Inspektion des Karotislumens, welche für das weitere Vorgehen und der Beurteilung des makroskopischen Plaquebefunds notwendig ist. Diese Vorgehensweise beeinflusst jedoch eine im nachhinein durchzuführende mikroskopische Auswertung, da der exzentrisch lokalisierte Plaque bei dieser Arteriotomie eingeschnitten oder reißen kann. Solch eine artifizielle, durch die OP-Technik hervorgerufene, Fissur kann bei der späteren Begutachtung nicht mehr eindeutig von spontan entstandenen Fissur unterschieden werden. Hierzu muss dann versucht werden, vor der Schnitthanfertigung eine solche artifizielle Fissur zu erkennen was in der Praxis nicht gelingt.

Zusätzlich führt die Weiterverarbeitung des operativ gewonnenen Plaquematerials zu einer denkbaren Verschleierung vorbestehender Fissuren, die vorher möglicherweise genau zwischen zwei später angefertigten transversen Intervallschnitten lokalisiert war. Die Schnittführung kann in Einzelfällen bei der späteren mikroskopischen Betrachtung eine fehlerhafte Klassifikation eines Plaque zur Folge haben.

Generell verbessert die Wahl der transversalen Schnitttechnik die Beurteilung luminal gelegener Endothelzellen, da die im wesentlichen luminal angefärbten Zellen eine Differenzierung von anliegenden subintimalen Strukturen erleichtern. Eine Schwierigkeit besteht in der Abgrenzung von auf die immunhistochemische Markierung positiv-reagierenden Gefäße, die infolge Neovaskularisierung (Vgl. Kapitel 2.4.4) entstehen. Diese können bei der transversalen Technik deutlicher von den am Gefäßlumen situierten Endothelien unterschieden werden. Weicht die Schnittführung stark von der transversalen Ebene ab, so wird diese Beurteilung zunehmend erschwert.

Auf der anderen Seite gibt es Hinweise in der Literatur, die eine transversale Schnitttechnik bemängeln: Tricot's Arbeitsgruppe stellte fest, dass unter Anwendung der transversalen Schnittführung lediglich die Beurteilung des maximal stenosierte Teils des Plaques erlaubt wird und so sämtliche „upstream“ und „downstream“

Anteile der Läsion ausser acht gelassen werden. Tricot zeigte in einer Studie ein erhebliches Auftreten der Apoptose in den „upstream“, poststenotischen Arealen, was als Konsequenz die Apoptosenfahndung auf weitere Areale ausser dem Bereich der Stenose ausdehnen sollte (Tricot et al., 2000). Aussagen über ein bevorzugtes Auftreten der Apoptosen, etwa in poststenotischen Arealen, konnten aus den von uns angefertigten histologischen Präparaten nicht getroffen werden, da in der histologischen Aufbereitung keine longitudinalen Schnitte zur Anwendung kamen. Die longitudinalen Schnitte erlauben durch Beurteilungsmöglichkeit des gesamten Blickfeldes eine exaktere Zuordnung zur vorliegenden Stenose im Gegensatz zu den transversalen Histologien.

5.2.5 Klassifizierung der Symptomatik

Vor der Einteilung des Patientenkollektivs in eine Gruppe symptomatischer, respektive asymptomatischer, Personen ist eine anamnestische Eruierung von oftmals zum Befragungszeitpunkt schon rückläufigen klinischen Symptomen (z.B. TIA) unabdingbare Voraussetzung. In vielen Fällen ist eine klinische Untersuchung im Nachhinein nicht mehr ergiebig um eine adäquate Bewertung einer Symptomatik zu ermöglichen.

Das von uns verwendete standardisierte Patienteninterview ist daher unter Umständen kritisch zu bewerten. Die Klassifikation des Kollektivs ist insofern schwierig, da Beschwerdebilder häufig von Seiten des Patienten unpräzise geschildert werden oder gar völlig negiert werden. Außerdem ist es möglich, dass Symptome unbemerkt auftreten, was die Konkretisierung der Beschwerden schlimmstenfalls unmöglich macht. Fortgeschrittenes Alter sowie beginnende Demenz führt ebenfalls zu einer nicht exakt konkretisierbaren Erfassung anamnestischer Angaben.

Es existieren außerdem variable Symptomenkomplexe, die nicht eindeutig einer einzigen Läsion eines bestimmten Stromgebiets zuzuordnen sind. Solche Symptome werden dann fälschlicherweise anderen Gefäßabschnitten zugeordnet oder irrtümlich

die gleichzeitig vorliegende Karotisstenose als die ursächliche Läsion verantwortlich gemacht.

5.3 Klinischer Ausblick

Derzeit ringen die operative Thrombendarteriektomie und die endovaskuläre Stentversorgung einer Karotisstenose um den Platz des Goldstandards bei der Therapie der höhergradigen, symptomatischen Karotisstenosen. Aufgrund des auf Nebenwirkungen zurückzuführenden, schmalen therapeutischen Korridors kommt der Verbesserung konservativer Massnahmen eine grosse Bedeutung zu.

Wegen der zunehmenden Beweislage für eine Beteiligung von Apoptose bei der Destabilisierung einer atherosklerotischen Plaque leiten sich daraus zumindest für die nahe Zukunft diagnostische und therapeutische Konsequenzen ab, die eine Formation, Progression und im Endstadium letztlich symptomatisch werdende Plaque positiv beeinflussen könnten.

5.3.1 Serologische Marker

Die Anerkennung der Rolle der Apoptose bei der Atherosklerose könnte zur Entwicklung neuer diagnostischer und prognostischer Marker bei der Evaluation akuter ischämischer Ereignisse führen. Zirkulierende apoptotische und nicht-apoptotische Mikropartikel könnten Marker für eine stumme oder drohende Thrombusformation darstellen und infolgedessen eine Destabilisierung einer Plaque andeuten.

Diagnostische Methoden, die auf die Erkennung von Apoptosevorgängen in vivo abzielen, wären von grossem Nutzen bei der Identifizierung instabiler atherosklerotischer Plaques. Allen voran sei hier die Detektion des Phosphatidylserins erwähnt, welches wie bereits erwähnt unter dem Ablauf von Apoptose auf betroffenen Zelloberflächen exprimiert wird (Blankenberg et al., 1998). Die Schwierigkeit des serologischen Nachweis von aktiv ablaufenden Apoptoseprogrammen besteht in der selektiven Erkennung unphysiologischer apoptotischer Vorgänge, da der programmierte Zelltod im humanen Organismus allgegenwärtig ist.

5.3.2 Therapieziel Apoptose?

Bei hochgradigen (>70%) Karotisstenosen stellt die operative Intervention derzeit das Mittel der Wahl bei der Therapie dar. Unter Berücksichtigung des perioperativen Risikos bei asymptomatischen oder niedriggradigen Stenosen ist der Augenmerk auf konservative Strategien von erheblicher Bedeutung. Die Ausführungen zur Rolle der Apoptose bei Progression und Destabilisierung einer atheromatösen Plaque haben verdeutlicht, welchen insgesamt nachteiligen Effekt dieser Prozess auf die Gefäßintegrität einnimmt. Dies suggeriert einen hohen Stellenwert einer anti-apoptotischen Therapie, die sowohl Initiation, Progression oder die Konsequenzen im Sinne ischämisch-thrombotischer Komplikationen verhindern könnte. Die Therapie müsste zum einen auf mögliche Auslöser der Apoptose abzielen, zum anderen direkte Mechanismen des ablaufenden Apoptoseprogramms terminieren.

Die zu entwickelnden Therapieansätze müssten allerdings äusserst präzise eingesetzt werden, da Apoptose durch den Evolutionsverlauf konserviert wurde und deswegen für den physiologischen Zellumsatz menschlicher Gewebe von eminenter Bedeutung ist. Eine systemische Blockade von Apoptoseprozessen könnte diesbezüglich deletäre Folgen für den Gesamtorganismus haben und den Grundumsatz vieler Gewebsarten, die fortlaufend Apoptose unterliegen, nachhaltig stören.

5.3.2.1 Antioxidantien

Eine auf Antioxidantien basierende Therapie ist im wesentlichen auf die Reduktion freier Sauerstoffradikale zurückzuführen (Young, Woodside, 2001). Diese könnte möglicherweise zur Minderung der innerhalb eines atherosklerotischen Plaque vermehrt auftretenden ROS therapeutischen Nutzen haben.

In Frage kommende Stoffe sind beispielsweise Vitamine (C und E) sowie die Gruppe der NADPH-Oxidaseinhibitoren, die eine der Hauptquellen des in Plaques lokalisierten, freien Radikals Superoxid hemmen. Vitamin E Analoga scheinen darüberhinaus sogar im Stande zu sein, eine endotheliale Apoptosenrate zu senken (Neuzil et al., 2002).

Die Rolle der Antioxidantien wurde wiederum kürzlich durch die prospektiv-randomisierte HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation) von Yusuf et al in Frage gestellt als gezeigt wurde dass eine dauerhafte Anwendung von Vitamin E Präparaten bei kardiovaskulären Hochrisikopatienten keine positiven Effekte auf ein verbessertes Outcome im Sinne von einer Reduktion von Neuereignissen erbringen konnten (Yusuf et al., 2000a).

5.3.2.2 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)

Neben den hypocholesterinämischen Eigenschaften werden den HMG-Coenzym A-Reduktase-Inhibitoren („Statine“) eine besondere Rolle bei der kardiovaskulären Mortalitätssenkung nachgesagt, sie stellen eine der Basistherapeutika der KHK dar. Eine besondere Rolle scheinen sie bei der Reduktion inflammatorischer Aktivität im Plaqueinneren zu besitzen, die bekanntermaßen Apoptosevorgänge zu unterhalten vermag. Statine scheinen Plaques zu stabilisieren und dadurch der Entwicklung von Komplikationen entgegenzuwirken. Pravastatin beispielsweise senkt die Parameter Apoptoserate, Lipidgehalt, Inflammation und MMP-Expression in humanen Karotisplaques, alles Mechanismen, die unter Suppression einer Destabilisierung entgegenwirken (Crisby et al., 2001). In Versuchstieren wurde unter der Statintherapie ein Rückgang an TF, Makrophagenproliferation und MMP-Gehalt beobachtet, alles weitere Zeichen für eine Stabilisierung der Läsion (Aikawa, Libby, 2004).

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Stabilitätsförderung ist die Wirkung der Statine auf periphere Monozyten, die sich nach der Migration in die Gefäßwand zu Makrophagen differenzieren: die Statinanwendung führten zu einer vermehrten Apoptoseaktivität der Monozyten, die so unter Umständen zu einer Minderung ortsständiger Makrophagen führen könnte (Vamvakopoulos, Green, 2003). Obgleich auch weitere Studien existieren, die eine Erhöhung von SMC-Apoptosenraten unter Statintherapie beschrieben haben müssen weitere Untersuchungen die genauen zellulären und molekularen Mechanismen der Statine bei der Atherosklerosetherapie beleuchten, um Aussagen bezüglich Einwirkung auf apoptotische Vorgänge speziell auf vaskulärer Ebene zu ermöglichen.

5.3.2.3 ACE-Hemmer

Vor kurzem konnte für die Gruppe der bei der antihypertensiven Therapie äußerst wirksamen ACE-Hemmern ein protektiver Effekt für die Entwicklung kardio- und zerebroischämischer Krankheitsbilder nachgewiesen werden (Yusuf et al., 2000b). Tedgui et al sind der Ansicht dass dieser Effekt möglicherweise in einer Reduktion von Endothelzellapoptosen begründet liegt, da das auf Endothelien proapoptotisch wirksame Angiotensin II (Dimmeler et al., 1997) unter ACE-Hemmer-Anwendung in verminderter Konzentration vorliegt.

5.3.2.4 Antiinflammatorische Therapie

Letzlich sollte an die hochinflammatorischen Komponenten des Plaqueinneren und deren Unterhaltsfunktion für Apoptosevorgänge erinnert werden. Die medikamentöse Beeinflussung mittels lokal wirksamer anti-inflammatorischer Wirkstoffe, die beispielsweise an dem bekannten, proinflammatorischen Zytokin Interleukin-10 (Mallat et al., 1999a) ansetzen, wäre vom theoretischen Ansatz her eine denkbare Option, um inflammatorische Prozesse innerhalb des Plaque zu dämpfen.

5.4 Fazit

Die Thrombusformation auf einer atherosklerotischen Plaque stellt das finale Ereignis ischämischer Prozesse im Rahmen der Atherogenese dar. Der üblicherweise programmierte und daher physiologische Zelltod (Apoptose) erlangt durch prokoagulatorische und proadhäsive Eigenschaften zunehmend pathologisches Augenmerk bei der Destabilisierung atherosklerotischer Läsionen. Welchen Anteil die Apoptose im Detail hierbei einnimmt, bleibt ungeklärt. Lediglich lässt sich eine regulatorische Bedeutung beimessen, die höchstwahrscheinlich nicht nur auf die atherosklerotischen Läsionen begrenzt bleibt.

Zu den Folgen einer Destabilisierung im Rahmen klinisch-ischämischer Symptome zählt nach bisherigem Kenntnisstand neben einer histologisch fassbaren Oberflächenruptur als alternativer Weg die Ausbildung einer Oberflächenerosion, die nicht durch die luminale Exposition von Plaqueinhalt in eine Thrombusformation

mündet. Die Endothelzellen spielen hierbei vermutlich die Schlüsselrolle aufgrund ihrer anatomischen Lokalisation am luminalen Teil der Gefäßwand.

Obgleich einer möglichen Verwicklung der Apoptose von Endothelzellen bei der Pathogenese der Atherosklerose existiert bislang keine Studie, die sich mit der Rolle der Endothelzellapoptosen bei der klinischen Destabilisierung eines Plaques befasst hat. Dieser Fragestellung sollte in der hier vorliegenden Studie nachgegangen werden. Bei einer insgesamt geringeren Plaquezahl, die bei unserer Studie zur Anwendung kam, konnte das generelle Auftreten von Endothelzellapoptosen bestätigt werden und war speziell auch auf unrupturierten Plaqueoberflächen präsent. Trotz der insgesamt niedrig bezifferten Apoptosenrate, bestand ein leichter Trend hin zur symptomatischen Patientengruppe, was eine Rolle des programmierten Zelltods der Endothelien bei der Destabilisierung unter Berücksichtigung der bislang existierenden Studienlage nahelegt. Eine Thrombogenitätssteigerung des Endothels nach Induktion von Apoptose ist bereits in der Vergangenheit erfolgreich nachgewiesen worden. Weitere, ausgedehnte Studien wären hilfreich um unsere Annahmen über die Rolle der Endothelzellapoptosen bei der Destabilisierung der fortgeschrittenen Atherosklerose zu bestätigen und zu konkretisieren.

Einen Ausblick der Bedeutung der Ergebnisse liefert die Betrachtung der Modulation von Apoptose, die einen klinisch wichtigen Ansatz zur therapeutischen Intervention einer Plaqueprogression darzustellen scheint. Die Entwicklung neuer antithrombotischer Strategien, die auf die Reduktion des apoptotischen Zelltods in einer atherosklerotischen Plaqueformation abzielen müsste, scheint hierbei einen sinnvollen Schritt sich entwickelnder Therapiekonzepte darzustellen. Es bleibt zukünftigen Studien überlassen, welche präzisen Methoden dieser Modulation einen insgesamt bremsenden Einfluss auf die Progression bestehender atheromatöser Plaques haben wird wobei gleichzeitig physiologische Apoptosevorgänge verschont bleiben.

6. Zusammenfassung

Die Atherosklerose stellt eine der Haupttodesursachen der westlichen Zivilisation dar. Die Karotisbifurkation ist eine der Lokalisationsorte für die Formierung einer atherosklerotischen Läsion, die sich nach Lumeneinengung schliesslich in neurologischen Symptomen bemerkbar machen kann.

In einer fortgeschrittenen, symptomatisch gewordenen Karotisplaque kann als charakteristisches Merkmal oftmals ein in der Literatur unter dem Begriff der „Ruptur“ bekannte Oberflächendefekt ausgemacht werden. Es gibt allerdings gehäuft Hinweise über eine Thrombusausbildung auf einer intakten Plaqueoberfläche. Es wird vermutet, dass hier apoptotische Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei Veränderungen der Gefässwand spielen, die letztlich für die Thrombusbildung verantwortlich ist. Aus diesen Überlegungen heraus untersuchten wir in der vorliegenden Studie das Ausmaß von Endothelzellapoptosen innerhalb eines Karotisplaque bei symptomatischen und asymptomatischen Patientengruppen.

Insgesamt wurden 38 stationäre Patienten mit einer $\geq 70\%$ -igen ACI-Stenose in die Studie eingeschlossen. Als symptomatisch galten die Patienten, die im Sinne von retinalen oder zerebralen TIA's oder durch sog. „minor strokes“ in einem Zeitraum von 60 Tagen vor dem Operationstag auffällig geworden waren.

Das asymptomatische Patientengut bestand aus den Patienten, bei denen die Karotisstenose als „Zufallsbefund“ aus Routineuntersuchungen in Klinik oder bei niedergelassenen Kollegen entdeckt wurde.

Die Plaques wurden „en bloc“ exzidiert. In den überwiesenden 33 Fällen wurde die Eversionstechnik durch den Operateur angewendet, bei der das Restlumen unbeschädigt bleibt. Nach Entfernung wurden die Präparate umgehend in 4%-iges Formalin fixiert. Nach Dekalzifizierung erfolgte die transversale Sektionierung in 2mm Scheiben. Jeder 2mm Block wurde in Paraffin eingebettet. Insgesamt wurde dann die Gesamtheit aller 279 Blöcke weiter in 3 μ m dicke Sektionen geschnitten. Das Vorliegen einer rupturierten Gefässwand wurde als ein intimaler Defekt grösser als 1000 μ m Breite definiert und für jedes Präparat dokumentiert.

Die vitalen Zellen der Endothelschicht wurden durch ein standardisiertes Färbeprotokoll (CD31 Immunhistochemie) sichtbar gemacht. Apoptotische

Endothelzellen konnten nach Anwendung der TUNEL-Technik visualisiert werden. Die Färbemethoden wurden jeweils zur Orientierung an angrenzenden Sektionen des Plaques durchgeführt. Die Bilder wurden digitalisiert und bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Eine Endothelzelle wurde als apoptotisch gewertet, wenn sie jeweils eine positive CD31-Markierung sowie eine positive TUNEL-Färbung in angrenzenden Gewebsschnitten auf sich vereinte.

Um das Ausmass der Apoptosen in den Reihen des Endothels zu quantifizieren wurde zunächst die Prozentzahl apoptotischer Endothelzellen pro Plaque Sektion ermittelt und anschliessend durch Berechnung des Medians aller konsekutiven Sektionen die mittlere Prozentzahl apoptotischer Zellen erhoben.

Insgesamt war das Auftreten von Apoptose innerhalb des Endothel rar; trotzdem zeigte die symptomatischen Patientengruppe eine signifikant höhere mittlere Prozentsatz apoptotischer Endothelzellen im Vergleich zu dem asymptomatischen Kollektiv. Zwischen den rupturierten und unrupturierten Plaques konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden, beide Gruppen unterschieden sich kaum.

Trotz des möglichen Stellenwerts apoptotischer Endothelzellen bei der fortgeschrittenen Atherosklerose existieren bis heute keine Studien, die das Ausmass derselben in Beziehung zu klinischen Symptomen gebracht haben. Bislang konnte der Nachweis dieser Zellreihe in atherosklerotischen Karotisplaques besonders im poststenotischen Bereich erbracht werden. Veränderungen lokaler Hämodynamik scheinen hier eine Rolle bei der Induktion von Apoptose zu spielen. Da in der hier vorliegenden Arbeit sich der Grad der Stenose kaum unterscheidet müssen alternative Wege bestehen, die Apoptose in atheromatösen Plaques fördert. Apoptotische Endothelien fördern ihrerseits prokoagulatorische Eigenschaften durch vermehrte Expression von thrombogenen Faktoren der Gerinnungskaskade. Das klassische Dogma der Plaqueruptur mit konsekutiver Freilegung des nekrotischen Kerns und Thrombusbildung muss daher erweitert werden, da nicht alle Plaques der vorliegenden Studie diese Oberflächendefekte aufwiesen. Durch das leichte Übergewicht des symptomatischen Kollektivs lassen sich diese Theorien der Apoptose als kritischer Faktor in der Progression atherosklerotischer Herde weiter

untermauern, benötigen aber weitere Studien um unter Umständen völlig andere Mechanismen aufzudecken.

7. Anhang

7.1 Summary

Atherosclerosis is one of the leading causes of death in the western civilization. The carotid bifurcation is one of the main localizations of an atherosclerotic plaque formation leading to neurological symptoms when a certain amount of lumen is becoming narrowly obstructed.

In high-grade ICA atherosclerotic lesions, the most common pathological feature associated with the development of symptoms is a surface disruption of the plaque, mostly described in the literature as “rupture”. However there is substantial evidence that thrombosis can also occur on a plaque surface which does not feature a site of rupture showing an entirely intact luminal vascular wall. It has been suggested in the past that an increased rate of endothelial cell (EC) apoptosis can lead to an altered state of the vascular wall prompting the formation of a local thrombus. Therefore we investigated the extent of EC apoptosis in patients with unstable, recently symptomatic, and patients with stable, asymptomatic high-grade ICA stenosis.

A total of 38 inpatients with a degree of stenosis $\geq 70\%$ were included prospectively in the study. Patients were classified as “symptomatic” if they reported retinal or cerebral transient ischaemic attacks or minor ischaemic strokes attributable to the high-grade ICA stenosis less than 60 days prior to surgery.

The group of “asymptomatic” patients included the patients that were prepared for surgery after a stenosis was detected during a routine-examination by an external physician (other hospital, home-physician).

All carotid plaques were excised en bloc. In 33 cases, the eversion technique was used so that the residual lumen was not incised. After removal in the OR, the specimen was immediately fixed in 4% formalin, decalcified, and sectioned transversely at 2mm intervals. Each 2mm tissue block was embedded separately in paraffin. A total number of 279 blocks were further sliced into 3 μ m sections. Rupture

was defined as an intimal defect larger than 1000µm in width, exposing the necrotic core of the atheroma.

The vital cells of the endothelial layer were visualized by staining with CD31 using the standardized immunohistochemistry protocol. Detection of in situ apoptotic endothelial cells was made possible using the TUNEL method according to the protocol described above. We selected adjacent sections for immunohistochemistry and TUNEL staining. Images of all plaque sections were digitized at a magnification of 40x. ECs were considered apoptotic if they showed both positive immunohistochemistry staining and positive TUNEL staining in the adjacent section. To measure the degree of EC apoptosis, the percentage of apoptotic ECs per plaque section was counted. Afterwards we worked out the mean percentage of apoptotic ECs by calculating the mean from all consecutive sections.

Overall, EC apoptosis was a rare finding; nevertheless the symptomatic patients showed a significantly higher median mean percentage of apoptotic endothelial cells. However, there was just a slight difference between the median average percentage of apoptotic ECs in ruptured and unruptured plaques. In the sub-group of unruptured plaques, the median average percentage of apoptotic cells was 0.0 and 0.3 in asymptomatic and symptomatic patients respectively.

Despite the potential implications of EC apoptosis in advanced atherosclerosis, no study investigating the relationship between the degree of EC apoptosis and clinically relevant thromboembolic events has yet been published. However, increased rates of EC apoptosis have been observed in atherosclerotic ICA plaque, particularly downstream from the point of maximal stenosis. Local hemodynamic contribute largely to EC turnover and apoptotic death; the fact that the patients in this study did not show large differences in the degree of stenosis suggests that other mechanisms promote EC apoptosis in plaques. It is thought that apoptotic endothelial cells become procoagulant through a variety of mechanisms each leading to the expression of procoagulatory states (e.g. expression of TF). Interestingly, the classical dogma of a ruptured-plaque can not be found on all thrombosed plaques. In these cases it is possible that EC apoptosis plays the major role in the promotion of surface thrombosis. Our results support this theory, showing that endothelial cell

apoptosis is a major factor in the atherosclerotic lesion and that a slight advantage of EC apoptosis in the symptomatic collective can be spotted.

7.1 Danksagungen

Viele Personen haben Anteil an der Vollendung der vorliegenden Arbeit.

Zunächst meinen aufrichtigsten Dank an Herrn Prof. Dr. Matthias Sitzler für die spontane Annahme als Doktorand, die vielen nützlichen Ideen, manche Verbesserungsvorschläge und die Einführung in die Thematik.

Herzlich bedanken möchte ich Herrn Dr. Frank Trostdorf für die außerordentlich gute Betreuung der Arbeit und die wertvollen Tips bei den letzten Korrekturen. Wann immer ich Hilfe benötigte – er war ansprechbar und hilfsbereit.

Weiterhin danke ich meinem „Vordoktranden“, Herrn Micha Kablau, für die allgemeine Einführung in die Räumlichkeiten des Hauses 95, die umfassende Heranführung an die Thematik sowie die ersten Hilfestellungen beim Beginn der Arbeit. Desweiteren danke ich allen nicht erwähnten Kollegen der neurologischen Universitätsklinik Frankfurt/Main für die reibungslose Arbeitsatmosphäre sowie die Unterstützung bei verschiedenen kleineren Fragestellungen.

Grossen Dank an die Gefäßchirurgischen Abteilungen der Universitätsklinik Frankfurt sowie den Städtischen Kliniken Frankfurt-Höchst. Mein besonderer Dank an die Herren Professoren T. Schmitz-Rixen und W.-J. Stelter für ihre Erläuterungen zu den verwendeten Operationstechniken. Ohne die intraoperative Asservierung der Präparate wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch dem mittlerweile nicht mehr in Höchst tätigen Oberarzt Herrn Dr. Umscheid herzlichsten Dank für die Fotos des OP-Situs.

Für die histologischen Färbetechniken und die Aufbereitung der Karotispräparate sei dem Frankfurter Edinger Institut gedankt. Ohne die Nutzung der dort verfügbaren Geräte und Materialien wäre eine histologische Untersuchung nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich meinen Eltern Danke sagen, die mich von jeher in jeder Hinsicht unterstützt haben. Schließlich danke ich meiner Freundin Vera Jütte, die mich – und ich sie umgekehrt – immer wieder motiviert hat, die Promotionsschrift zu vollenden.

7.2 Lebenslauf

Zur Person

Name:	Christian Robert Emmerich Landgraf
geboren	23. November 1975 in Erlangen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
 Anschrift	 Egenolffstrasse 10 D - 60316 Frankfurt am Main
Telefon	069 – 814 901
Mobil	0177 – 963 09 41
E-mail	christianlandgraf@web.de

Schul Ausbildung

Aug. 1982 - Jul. 1988	Heinrich Heine Schule, Hanau (Grundschule+Förderstufe)
Aug. 1988 - Apr. 1996	Hohe Landesschule, Hanau (Gymnasium)
25. Jun. 1996	Abitur

Ersatzdienst

Okt. 1996 - Okt. 1997	Zivildienst, Deutsches Rotes Kreuz Kreisverband Hanau
Feb. 1998	Ausbildung zum Rettungssanitäter, DRK Frankfurt.

Hochschulausbildung

Apr. 1998	Beginn Studium Humanmedizin (JWG-Universität, Frankfurt am Main)
22. Sep. 2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
28. Aug. 2001	1. Staatsexamen
Mrz. 2004	2. Staatsexamen
Mrz. 2004 - Mrz. 2005	Praktisches Jahr, Städt. Kliniken Frankfurt-Höchst:

7. Jun. 2005

3. Staatsexamen

Studienbegleitende Tätigkeiten

WS 2001/02

Wissenschaftlicher Assistent, Zentrum für Anatomie,
Universitätsklinik Frankfurt am Main (Prof. Dr. T. Deller)

Okt. 1997 - Jul. 2005

Rettungssanitäter, DRK Kreisverband Hanau

Medizinische Laufbahn

Nov. 2006 -

Assistenzarzt, Institut für Anästhesiologie / Intensivmedizin
/ Schmerztherapie / Notfallmedizin, Städtische Kliniken
Frankfurt-Höchst (Prof. Dr. H. W. Striebel)

7.3 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „**Bedeutung von Endothelzellapoptosen bei der Destabilisierung der hochgradigen Karotisstenose**“ in der Klinik für Neurologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Matthias Sitzler mit Unterstützung durch Herrn Dr. Frank Trostdorf ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, Jan. 2007.

(„Increased Endothelial Cell Apoptosis in Unstable High-Grade Carotid Artery Stenosis“, Eur J Vasc Endovasc Surg. 2007 Jan; 33(1):65-8. Epub 2006 Oct 24.)

.....

Frankfurt, den 10. März 2007

(Christian Landgraf)

8. Literaturverzeichnis

1984. Immediate anticoagulation of embolic stroke: brain hemorrhage and management options. Cerebral Embolism Study Group. *Stroke* 15:779-789.

1991a. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 325:445-453.

1991b. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. Methods, patient characteristics, and progress. *Stroke* 22:711-720.

1995. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA* 273:1421-1428.

1998. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 351:1379-1387.

Aikawa M, Libby P. 2004. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 13:125-138.

Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, Alvarez-Sabin J, Matas M. 2004. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 40:469-475.

Alvarez GB, Ruiz C, Chacon P, Sabin JA, Matas M. 2003. High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 38:1018-1024.

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. 1991. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11:1223-1230.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.

Assmann G, Carmena R, Cullen P, Fruchart JC, Jossa F, Lewis B, Mancini M, Paoletti R. 1999. Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation* 100:1930-1938.

- Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L. 1999. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 99:1780-1787.
- Banfi C, Camera M, Giandomenico G, Toschi V, Arpaia M, Mussoni L, Tremoli E, Colli S. 2003. Vascular thrombogenicity induced by progressive LDL oxidation: protection by antioxidants. *Thromb Haemost* 89:544-553.
- Barbato JE, Tzeng E. 2004. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg* 40:187-193.
- Barnathan ES, Kuo A, Van der KH, McCrae KR, Larsen GR, Cines DB. 1988. Tissue-type plasminogen activator binding to human endothelial cells. Evidence for two distinct binding sites. *J Biol Chem* 263:7792-7799.
- Barnett HJ, Meldrum HE. 2000. Carotid endarterectomy: a neurotherapeutic advance. *Arch Neurol* 57:40-45.
- Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. 1998. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 339:1415-1425.
- Bassiouny HS, Sakaguchi Y, Mikucki SA, McKinsey JF, Piano G, Gewertz BL, Glagov S. 1997. Juxtalumenal location of plaque necrosis and neoformation in symptomatic carotid stenosis. *J Vasc Surg* 26:585-594.
- Bauer KA, Weiss LM, Sparrow D, Vokonas PS, Rosenberg RD. 1987. Aging-associated changes in indices of thrombin generation and protein C activation in humans. Normative Aging Study. *J Clin Invest* 80:1527-1534.
- Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Luderitz B. 1999. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 41:480-488.
- Beks PH, Mackaay AJ, de Vries H, De Neeling JN, Bouter LM, Heine RJ. 1997. Carotid artery stenosis is related to blood glucose level in an elderly Caucasian population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 40:290-298.

Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. 1995. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 6:3-16.

Berceli SA, Davies MG, Kenagy RD, Clowes AW. 2002. Flow-induced neointimal regression in baboon polytetrafluoroethylene grafts is associated with decreased cell proliferation and increased apoptosis. *J Vasc Surg* 36:1248-1255.

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8.

Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. 2004. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10:416-421.

Bjorkerud S, Bjorkerud B. 1996. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 149:367-380.

Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kopiwoda S, Abrams MJ, Darkes M, Robbins RC, Maecker HT, Strauss HW. 1998. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6349-6354.

Bogousslavsky J, Regli F, Van Melle G. 1985. Risk factors and concomitants of internal carotid artery occlusion or stenosis. A controlled study of 159 cases. *Arch Neurol* 42:864-867.

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. 1997. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 89:2429-2442.

Bombeli T, Muller M, Straub PW, Haeberli A. 1996. Cyclosporine-induced detachment of vascular endothelial cells initiates the intrinsic coagulation system in plasma and whole blood. *J Lab Clin Med* 127:621-634.

Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. 1999. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 93:3831-3838.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897.

- Brinkman HJ, Mertens K, Holthuis J, Zwart-Huinink LA, Grijm K, van Mourik JA. 1994. The activation of human blood coagulation factor X on the surface of endothelial cells: a comparison with various vascular cells, platelets and monocytes. *Br J Haematol* 87:332-342.
- Brogi E, Winkles JA, Underwood R, Clinton SK, Alberts GF, Libby P. 1993. Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. *J Clin Invest* 92:2408-2418.
- Broze GJ, Jr. 1995. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 74:90-93.
- Buchman TG, Abello PA, Smith EH, Bulkley GB. 1993. Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin. *Am J Physiol* 265:H165-H170.
- Burrig KF. 1991. The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb* 11:1678-1689.
- Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson GK. 2001. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* 103:2834-2838.
- Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE. 1988. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med* 112:977-986.
- Carlos TM, Harlan JM. 1990. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev* 114:5-28.
- Carlos TM, Harlan JM. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101.
- Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. 1971. Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 177:109-159.
- Carpenter KL, Taylor SE, van d, V, Williamson BK, Ballantine JA, Mitchinson MJ. 1995. Lipids and oxidised lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development. *Biochim Biophys Acta* 1256:141-150.
- Carr S, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. 1996. Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 23:755-765.

- Carr SC, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS. 1997. Activated inflammatory cells are associated with plaque rupture in carotid artery stenosis. *Surgery* 122:757-763.
- Carson SD, Johnson DR, Tracy SM. 1993. Tissue factor and the extrinsic pathway of coagulation during infection and vascular inflammation. *Eur Heart J* 14 Suppl K:98-104.
- Chen CH, Jiang T, Yang JH, Jiang W, Lu J, Marathe GK, Pownall HJ, Ballantyne CM, McIntyre TM, Henry PD, Yang CY. 2003. Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation* 107:2102-2108.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Poher JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527-3561.
- Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. 2004. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 64:172-178.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. 1994. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46:205-229.
- Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. 2004. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 17:35-44.
- Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. 2001. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 103:926-933.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251:788-791.
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. 2001. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107:1255-1262.

Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. 1986. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2114-2117.

DeGraba TJ, Siren AL, Penix L, McCarron RM, Hargraves R, Sood S, Pettigrew KD, Hallenbeck JM. 1998. Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* 29:1405-1410.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. 2004a. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 34:392-401.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. 2004b. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 34:392-401.

Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM. 1996. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399:71-74.

Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. 1997. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81:970-976.

Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal-Vanaclocha F. 1995. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 3):967-973.

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. 1995. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 77:863-868.

Durand E, Scoazec A, Lafont A, Boddaert J, Al Hajzen A, Addad F, Mirshahi M, Desnos M, Tedgui A, Mallat Z. 2004. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion. *Circulation* 109:2503-2506.

Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, Ueffing M, Scheurich P, Hieke A, Multhoff G, Bornkamm GW, Holler E. 1995. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 86:4184-4193.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.

- Esmon CT. 1995. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 9:946-955.
- Esmon CT, Fukudome K. 1995. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol* 6:259-268.
- Esposito G, Blasi F, Allegra L, Chiesa R, Melissano G, Cosentini R, Tarsia P, Dordoni L, Cantoni C, Arosio C, Fagetti L. 1999. Demonstration of viable Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques of carotid arteries by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg* 13:421-425.
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. 1998a. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5:551-562.
- Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108:957-962.
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. 1992. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149:4029-4035.
- Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. 1998b. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol* 161:6250-6257.
- Falk E. 1991. Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations. *Am J Cardiol* 68:28B-35B.
- Falk E, Shah PK, Fuster V. 1995. Coronary plaque disruption. *Circulation* 92:657-671.
- Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. 1996a. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 93:1354-1363.
- Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. 1996b. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 93:1354-1363.

- Farber A, Kitzmiller T, Morganelli PM, Pfeiffer J, Groveman D, Wagner RJ, Cronenwett JL, Powell RJ. 1999. A caspase inhibitor decreases oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in bovine endothelial cells. *J Surg Res* 85:323-330.
- Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. 2000. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105:1049-1056.
- Fine-Edelstein JS, Wolf PA, O'Leary DH, Poehlman H, Belanger AJ, Kase CS, D'Agostino RB. 1994. Precursors of extracranial carotid atherosclerosis in the Framingham Study. *Neurology* 44:1046-1050.
- Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. 1997. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood* 89:4378-4384.
- Ford CS, Crouse JR, III, Howard G, Toole JF, Ball MR, Frye J. 1985. The role of plasma lipids in carotid bifurcation atherosclerosis. *Ann Neurol* 17:301-303.
- Fournet-Bourguignon MP, Castedo-Delrieu M, Bidouard JP, Leonce S, Saboureau D, Delescluse I, Vilaine JP, Vanhoutte PM. 2000. Phenotypic and functional changes in regenerated porcine coronary endothelial cells : increased uptake of modified LDL and reduced production of NO. *Circ Res* 86:854-861.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 326:310-318.
- Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. 2005. Atherothrombosis and high-risk plaque part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 46:937-954.
- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. 1995. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:402-406.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94:2493-2503.

- Garcia JG, Pavalko FM, Patterson CE. 1995. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6:609-626.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. 1996. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 93:229-237.
- Geng YJ, Libby P. 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 147:251-266.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. 1999. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2311-2315.
- Gimbrone MA, Jr., Nagel T, Topper JN. 1997. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 100:S61-S65.
- Goldbourt U, Neufeld HN. 1986. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 6:357-377.
- Goldstein LB. 2003. Extracranial carotid artery stenosis. *Stroke* 34:2767-2773.
- Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. 1994. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 158:485-494.
- Gordon DJ, Rifkind BM. 1989. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 321:1311-1316.
- Greeno EW, Bach RR, Moldow CF. 1996. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest* 75:281-289.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2:275-281.

- Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. 1995. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 147:267-277.
- Hansson GK. 2001. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1876-1890.
- Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695.
- Hansson GK, Chao S, Schwartz SM, Reidy MA. 1985. Aortic endothelial cell death and replication in normal and lipopolysaccharide-treated rats. *Am J Pathol* 121:123-127.
- Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. 1997. Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 133:213-219.
- Hennerici M, Hulsbomer HB, Hefter H, Lammerts D, Rautenberg W. 1987. Natural history of asymptomatic extracranial arterial disease. Results of a long-term prospective study. *Brain* 110 (Pt 3):777-791.
- Hess KL, Tudor KS, Johnson JD, Osati-Ashtiani F, Askew DS, Cook-Mills JM. 1997. Human and murine high endothelial venule cells phagocytose apoptotic leukocytes. *Exp Cell Res* 236:404-411.
- Hladovec J, Prerovsky I. 1989. Endothelial lesion in hypertension. *Cor Vasa* 31:51-54.
- Hladovec J, Prerovsky I, Stanek V, Fabian J. 1978. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr* 56:1033-1036.
- Hu H, Pierce GN, Zhong G. 1999. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest* 103:747-753.
- Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N. 2002. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:101-107.
- Ignarro LJ. 1989. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 65:1-21.

Inagaki Y, Yamagishi S, Amano S, Okamoto T, Koga K, Makita Z. 2002. Interferon-gamma-induced apoptosis and activation of THP-1 macrophages. *Life Sci* 71:2499-2508.

Inzitari D, Bianchi F, Pracucci G, Albanese V, Argentino C, Bono G, Brambilla GL, Candelise L, De Zanche L, Mariani F, . 1986. The Italian Multicenter Study of reversible cerebral ischemic attacks: IV--Blood pressure components and atherosclerotic lesions. *Stroke* 17:185-192.

Inzitari D, Eliasziw M, Gates P, Sharpe BL, Chan RK, Meldrum HE, Barnett HJ. 2000. The causes and risk of stroke in patients with asymptomatic internal-carotid-artery stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 342:1693-1700.

Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. 1995. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91:2703-2711.

Jander S, Sitzler M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H, Stoll G. 1998. Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. *Stroke* 29:1625-1630.

Jander S, Sitzler M, Wendt A, Schroeter M, Buchkremer M, Siebler M, Muller W, Sandmann W, Stoll G. 2001. Expression of tissue factor in high-grade carotid artery stenosis: association with plaque destabilization. *Stroke* 32:850-854.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.

Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. 1994. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24:1591-1601.

Jovinge S, Crisby M, Thyberg J, Nilsson J. 1997. DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2225-2231.

Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, Vanhaesbroucke C, Devos P, Cosson A, Asseman P. 1994. Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation* 90:1662-1668.

Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. 1996. Mast cells accompany microvessels in human coronary atheromas: implications for intimal neovascularization and hemorrhage. *Atherosclerosis* 123:123-131.

Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. 1997. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 231:586-590.

Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. 2002. Chlamydia pneumoniae as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA* 288:2724-2731.

Kansas GS. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88:3259-3287.

Karason K, Wikstrand J, Sjöström L, Wendelhag I. 1999. Weight loss and progression of early atherosclerosis in the carotid artery: a four-year controlled study of obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:948-956.

Kaufmann SH, Hengartner MO. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-534.

Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM. 2005. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost* 3:465-472.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N. 2000. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 105:451-458.

Kockx MM. 1998. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1519-1522.

Kockx MM, Cambier BA, Bortier HE, De Meyer GR, Declercq SC, van Cauwelaert PA, Bultinck J. 1994. Foam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts. *Histopathology* 25:365-371.

Kockx MM, De Meyer GR, Buysens N, Knaapen MW, Bult H, Herman AG. 1998a. Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res* 83:378-387.

Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. 1998b. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97:2307-2315.

Kockx MM, Herman AG. 1998. Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 19 Suppl G:G23-G28.

Kockx MM, Herman AG. 2000. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 45:736-746.

Kockx MM, Knaapen MW. 2000. The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 190:267-280.

Kockx MM, Muhring J, Bortier H, De Meyer GR, Jacob W. 1996b. Biotin- or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 148:1771-1777.

Kockx MM, Muhring J, Bortier H, De Meyer GR, Jacob W. 1996a. Biotin- or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 148:1771-1777.

Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, De Meyer GR. 1998c. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 152:885-888.

Kojda G, Harrison D. 1999. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43:562-571.

Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R. 2000. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 157:1259-1268.

Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J. 1999. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 100:1154-1160.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4651-4655.

LaBiche R, Koziol D, Quinn TC, Gaydos C, Azhar S, Ketron G, Sood S, DeGraba TJ. 2001. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* 32:855-860.

Lammie GA, Sandercock PA, Dennis MS. 1999. Recently occluded intracranial and extracranial carotid arteries. Relevance of the unstable atherosclerotic plaque. *Stroke* 30:1319-1325.

Lammie GA, Wardlaw J, Allan P, Ruckley CV, Peek R, Signorini DF. 2000. What pathological components indicate carotid atheroma activity and can these be identified reliably using ultrasound? *Eur J Ultrasound* 11:77-86.

Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. 1993. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 123:7-22.

Leiß O, v.Bergmann. 1987. Risikofaktoren zerebraler Durchblutungsstörungen. In: Hartmann, Wassmann, eds. *Hirnfarkt: Ätiologie, Diagnose, Prophylaxe, Therapie*. München: Urban & Schwarzenberg. pp 136-154.

Leskinen M, Wang Y, Leszczynski D, Lindstedt KA, Kovanen PT. 2001. Mast cell chymase induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:516-522.

Levin ER. 1996. Endothelins as cardiovascular peptides. *Am J Nephrol* 16:246-251.

Li DY, Chen HJ, Staples ED, Ozaki K, Annex B, Singh BK, Vermani R, Mehta JL. 2002. Oxidized low-density lipoprotein receptor LOX-1 and apoptosis in human atherosclerotic lesions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 7:147-153.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13:197-204.

Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.

Libby P, Geng YJ, Sukhova GK, Simon DI, Lee RT. 1997. Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability. *Ann N Y Acad Sci* 811:134-142.

- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143.
- Lin SJ. 1996. Risk factors, endothelial cell turnover and lipid transport in atherogenesis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 58:309-316.
- Linton MF, Fazio S. 2003. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S35-S40.
- Littlewood TD, Bennett MR. 2003. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 14:469-475.
- Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. 2000. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 31:40-47.
- Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD. 1990. Vascular responses to endothelin-1 in atherosclerotic primates. *Arteriosclerosis* 10:1113-1118.
- Lorant DE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. 1995. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol* 6:295-303.
- Loscalzo J, Welch G. 1995. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 38:87-104.
- Lutgens E, Daemen M, Kockx M, Doevendans P, Hofker M, Havekes L, Wellens H, de Muinck ED. 1999a. Atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice: from proliferative to atheromatous stage. *Circulation* 99:276-283.
- Lutgens E, de Muinck ED, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Wellens HJ, Daemen MJ. 1999b. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 41:473-479.
- Maehara A, Mintz GS, Bui AB, Walter OR, Castagna MT, Canos D, Pichard AD, Satler LF, Waksman R, Suddath WO, Laird JR, Jr., Kent KM, Weissman NJ. 2002. Morphologic and angiographic features of coronary plaque rupture detected by intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 40:904-910.

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. 2000. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101:841-843.

Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, Tedgui A. 2001a. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 104:1598-1603.

Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B, Humbert Y, Chvatchko Y, Tedgui A. 2001b. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res* 89:E41-E45.

Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Leseche G, Tedgui A. 1999a. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:611-616.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. 1999b. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99:348-353.

Mallat Z, Tedgui A. 2001. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 88:998-1003.

Marcum JA, Rosenberg RD. 1984. Anticoagulant active heparin-like molecules from vascular tissue. *Biochemistry* 23:1730-1737.

Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF, Jr., Welch GN, Loscalzo J. 1995. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 96:2630-2638.

Markus H, Cullinane M. 2001. Severely impaired cerebrovascular reactivity predicts stroke and TIA risk in patients with carotid artery stenosis and occlusion. *Brain* 124:457-467.

Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubman MB. 1993. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest* 91:2253-2259.

Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F, Weiss DG, Messina L, Hershey LA, Colling C, Eskridge J, Deykin D, Winn HR. 1991. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in

symptomatic carotid stenosis. Veterans Affairs Cooperative Studies Program 309 Trialist Group. *JAMA* 266:3289-3294.

Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. 1990. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 265:19028-19034.

Michowitz Y, Goldstein E, Roth A, Afek A, Abashidze A, Ben Gal Y, Keren G, George J. 2005. The involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 45:1018-1024.

Mofidi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV. 2001. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br J Surg* 88:945-950.

Molloy J, Markus HS. 1999. Asymptomatic embolization predicts stroke and TIA risk in patients with carotid artery stenosis. *Stroke* 30:1440-1443.

Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PR, Naylor AR, Loftus IM. 2004. Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *Circulation* 110:337-343.

Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. 1996. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 94:3090-3097.

Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. 1994. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 90:775-778.

Mukherjee S, Coaxum SD, Maleque M, Das SK. 2001. Effects of oxidized low density lipoprotein on nitric oxide synthetase and protein kinase C activities in bovine endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 47:1051-1058.

Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. 1999. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93:2951-2958.

Nadareishvili ZG, Koziol DE, Szekely B, Ruetzler C, LaBiche R, McCarron R, DeGraba TJ. 2001. Increased CD8(+) T cells associated with Chlamydia pneumoniae in symptomatic carotid plaque. *Stroke* 32:1966-1972.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr., Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108:1664-1672.

Napoli C, De Nigris F, Palinski W. 2001. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 82:674-682.

Nemerson Y. 1995. Tissue factor: then and now. *Thromb Haemost* 74:180-184.

Nerem RM. 1992. Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis. *J Biomech Eng* 114:274-282.

Neuzil J, Kagedal K, Andera L, Weber C, Brunk UT. 2002. Vitamin E analogs: a new class of multiple action agents with anti-neoplastic and anti-atherogenic activity. *Apoptosis* 7:179-187.

Newby AC, Zaltsman AB. 1999. Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41:345-360.

Nicholson AC. 2004. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc Med* 14:8-12.

Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. 1995. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 76:536-543.

O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. 1994. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 145:883-894.

- Odrliin TM, Francis CW, Sporn LA, Bunce LA, Marder VJ, Simpson-Haidaris PJ. 1996. Heparin-binding domain of fibrin mediates its binding to endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1544-1551.
- Ogata J, Yutani C, Kaneko T, Kuriyama Y, Sawada T. 1987. Rupture of atheromatous plaque as a cause of thrombotic occlusion of the internal carotid artery. *Stroke* 18:1175-1176.
- Osler W. 1908. *Diseases of the arteries*. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Pandolfi M. 1975. Histochemistry of tissue plasminogen activator. *Thromb Diath Haemorrh* 34:661-663.
- Pike AC, Brzozowski AM, Roberts SM, Olsen OH, Persson E. 1999. Structure of human factor VIIa and its implications for the triggering of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8925-8930.
- Poeck K. 1994. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. 1994. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 214:584-594.
- Preissner KT. 1989. The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems. *Blut* 59:419-431.
- Prydz H, Pettersen KS. 1988. Synthesis of thromboplastin (tissue factor) by endothelial cells. *Haemostasis* 18:215-223.
- Rajagopalan V, Essex DW, Shapiro SS, Konkle BA. 1992. Tumor necrosis factor-alpha modulation of glycoprotein Ib alpha expression in human endothelial and erythroleukemia cells. *Blood* 80:153-161.
- Rapaport SI, Rao LV. 1995. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 74:7-17.
- Rapp JH, Connor WE, Lin DS, Inahara T, Porter JM. 1983. Lipids of human atherosclerotic plaques and xanthomas: clues to the mechanism of plaque progression. *J Lipid Res* 24:1329-1335.

- Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. 2001. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 134:224-238.
- Ray R, Shah AM. 2005. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 109:217-226.
- Rosenberg RD, Rosenberg JS. 1984. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 74:1-6.
- Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.
- Ross R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
- Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E. 1984. The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 70:III77-III82.
- Rossi ML, Marziliano N, Merlini PA, Bramucci E, Canosi U, Belli G, Parenti DZ, Mannucci PM, Ardissino D. 2004. Different quantitative apoptotic traits in coronary atherosclerotic plaques from patients with stable angina pectoris and acute coronary syndromes. *Circulation* 110:1767-1773.
- Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. 2001. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 96:11-22.
- Sacco R. 1994. Ischemic stroke. In: Gorelick P, Alter M, eds. *Handbook of Neuroepidemiology*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Decker Inc. pp 77-119.
- Sagripanti A, Carpi A. 1998. Natural anticoagulants, aging, and thromboembolism. *Exp Gerontol* 33:891-896.
- Sagripanti A, Carpi A. 2000. Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomed Pharmacother* 54:107-111.
- Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V. 1988. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2:983-986.

- Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, van der Laan LJ, Kraal G, Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K. 1998. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 78:423-434.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. 2002. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:213-221.
- Sata M, Walsh K. 1998. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 102:1682-1689.
- Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788.
- Sawdey MS, Loskutoff DJ. 1991. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 88:1346-1353.
- Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. 1997. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 81:448-454.
- Simonson MS, Dunn MJ. 1990. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 4:2989-3000.
- Sitzer M, Muller W, Siebler M, Hort W, Kniemeyer HW, Jancke L, Steinmetz H. 1995. Plaque ulceration and lumen thrombus are the main sources of cerebral microemboli in high-grade internal carotid artery stenosis. *Stroke* 26:1231-1233.
- Sitzer M, Skutta M, Siebler M, Sitzler G, Siegrist J, Steinmetz H. 1998. Modifiable stroke risk factors in volunteers willing to participate in a prevention program. *Neuroepidemiology* 17:179-187.
- Sitzer M, Trostorf F. 2003. [The unstable carotid stenosis: definition and biological processes]. *Hamostaseologie* 23:61-66.
- Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. 2002. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417:750-754.

- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. 1995. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8264-8268.
- Spencer MP. 1996. Doppler Microembolic Signals for Diagnosis of Ulcerated Carotid Artery Plaques. *Echocardiography* 13:551-554.
- Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J. 1989. Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglycerin. *Circ Res* 65:796-804.
- Stary HC. 2000. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 72:1297S-1306S.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92:1355-1374.
- Stern D, Nawroth P, Handley D, Kiesel W. 1985. An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2523-2527.
- Stern DM, Kaiser E, Nawroth PP. 1988. Regulation of the coagulation system by vascular endothelial cells. *Haemostasis* 18:202-214.
- Stoneman VE, Bennett MR. 2004. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond)* 107:343-354.
- Stork JL, Kimura K, Levi CR, Chambers BR, Abbott AL, Donnan GA. 2002. Source of microembolic signals in patients with high-grade carotid stenosis. *Stroke* 33:2014-2018.
- Stuart MC, Damoiseaux JG, Frederik PM, Arends JW, Reutelingsperger CP. 1998. Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. *Eur J Cell Biol* 76:77-83.
- Sutton-Tyrrell K, Evans RW, Meilahn E, Alcorn HG. 1996. Lipoprotein(a) and peripheral atherosclerosis in older adults. *Atherosclerosis* 122:11-19.

Taguchi S, Oinuma T, Yamada T. 2000. A comparative study of cultured smooth muscle cell proliferation and injury, utilizing glycated low density lipoproteins with slight oxidation, auto-oxidation, or extensive oxidation. *J Atheroscler Thromb* 7:132-137.

Tedgui A, Mallat Z. 2000. Smooth muscle cells : another source of tissue factor-containing microparticles in atherothrombosis? *Circ Res* 87:81-82.

Tell GS, Polak JF, Ward BJ, Kittner SJ, Savage PJ, Robbins J. 1994. Relation of smoking with carotid artery wall thickness and stenosis in older adults. The Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation* 90:2905-2908.

Terry CM, Callahan KS. 1996. Protein kinase C regulates cytokine-induced tissue factor transcription and procoagulant activity in human endothelial cells. *J Lab Clin Med* 127:81-93.

TODD AS. 1959. The histological localisation of fibrinolysin activator. *J Pathol Bacteriol* 78:281-283.

Topol EJ, Yadav JS. 2000. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation* 101:570-580.

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. 1997. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95:594-599.

Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. 2000. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101:2450-2453.

Trostdorf F, Buchkremer M, Harmjanz A, Kablau M, Jander S, Geiger K, Schmitz-Rixen T, Steinmetz H, Sitzer M. 2005. Fibrous cap thickness and smooth muscle cell apoptosis in high-grade carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29:528-535.

Trostdorf F, Landgraf C, Kablau M, Schmitz-Rixen T, Sitzer M. 2007. Increased endothelial cell apoptosis in symptomatic high-grade carotid artery stenosis: preliminary data. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 33:65-68.

Urbich C, Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. 2000. Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis. *Circ Res* 87:683-689.

Valgimigli M, Agnoletti L, Curello S, Comini L, Francolini G, Mastroianni F, Merli E, Pirani R, Guardigli G, Grigolato PG, Ferrari R. 2003a. Serum from patients with acute coronary syndromes displays a proapoptotic effect on human endothelial cells: a possible link to pan-coronary syndromes. *Circulation* 107:264-270.

Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. 2003b. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 420:255-261.

Vamvakopoulos JE, Green C. 2003. HMG-CoA reductase inhibition aborts functional differentiation and triggers apoptosis in cultured primary human monocytes: a potential mechanism of statin-mediated vasculoprotection. *BMC Cardiovasc Disord* 3:6.

van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. 1994. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89:36-44.

Viles-Gonzalez JF, Anand SX, Valdiviezo C, Zafar MU, Hutter R, Sanz J, Rius T, Poon M, Fuster V, Badimon JJ. 2004. Update in atherothrombotic disease. *Mt Sinai J Med* 71:197-208.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1262-1275.

Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. 1998. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 97:108-112.

Wilson PW, Hoeg JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Belanger AM, Poehlmann H, O'Leary D, Wolf PA. 1997. Cumulative effects of high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis. *N Engl J Med* 337:516-522.

Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.

Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176-186.

Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. 2000a. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:154-160.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. 2000b. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:145-153.

Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM, Topham MK, Weyrich AS, Whatley RE. 1996. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* 416:297-304.